

Hypermodifizierte Nukleoside in Säuger-tRNA:
Sequenzanalyse einer lysinspezifischen
Transfer-Ribonukleinsäure aus Kaninchenleber

Klaus Limburg

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554614_0030

Hypermodifizierte Nukleoside in Säuger-tRNA :

Sequenzanalyse einer lysinspezifischen

Transfer-Ribonukleinsäure aus Kaninchenleber.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

München

Vorgelegt

von

Klaus Limburg

aus

Zwickau

1976



1. Berichterstatter

Prof. Dr. W. Zillig

2. Berichterstatter

Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung : 20. Juli 1976

Meinen Eltern

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung "Organische Chemie und Spektroskopie" (Direktor Prof. Dr. H. Dannenberg, verstorben am 22.2.1975) unter der Anleitung von Herrn Dr. habil. H.J. Gross in der Zeit von November 1972 bis Dezember 1975 durchgeführt.

Herrn Dr. H.J. Gross bin ich besonders dankbar für die stete Hilfe, für viele Ratschläge und zahlreiche kritische Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. U.L. RajBhandary und seiner Gruppe vom MIT, Cambridge, Mass., USA, danke ich für gute Zusammenarbeit.

Herrn Dr. M. Saneyoshi, Tokio, danke ich für die Überlassung einer unveröffentlichten Vorschrift zur zweidimensionalen Dünnschichtchromatographie von Nukleotiden.

Den Herren Dr. H. Vorbrüggen, Berlin und Dr. K.H. Scheit, Göttingen, danke ich für die Synthese von 2-Thiouridin-derivaten.

Herrn Dr. W. Schäfer und FrI. I. Buhrow danke ich für die Aufnahme der Massenspektren und die wertvolle Hilfe bei der Interpretation.

FrI. H. Alberty gilt mein besonderer Dank für tatkräftige Hilfe bei der Durchführung meiner Versuche.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Ergebnisse	7
2.1. Isolierung von tRNA ^{Lys} ₃ aus Kaninchenleber-tRNA durch Säulenchromatographie	7
2.1.1. Säulenchromatographie von Kaninchenleber-tRNA an DEAE-Sephadex A-50	7
2.1.2. Weitere Reinigung von tRNA ^{Lys} ₃ an benzylierter DEAE-Zellulose	8
2.1.3. Dritte Säulenchromatographie zur Reinigung von tRNA ^{Lys} ₃ auf RPC-5	9
2.2. Spaltung von tRNA ^{Lys} ₃ mit pankreatischer Ribonuklease und Charakterisierung der Fragmente	10
2.2.1. Präparative Spaltung von tRNA ^{Lys} ₃ mit pankreatischer Ribonuklease und Auftrennung der Fragmente durch Säulenchromatographie auf DEAE-Zellulose (DE-23) in 7 M Harnstoff	11
2.2.2. Identifizierung der pankreatischen Spaltstücke	12
2.3. Sequenzanalyse von tRNA ^{Lys} ₃ durch "in vitro" [³² P] -Markierung von Spaltprodukten	26

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Ergebnisse	7
2.1. Isolierung von tRNA ₃ ^{Lys} aus Kaninchenleber-tRNA durch Säulenchromatographie	7
2.1.1. Säulenchromatographie von Kaninchenleber-tRNA an DEAE-Sephadex A-50	7
2.1.2. Weitere Reinigung von tRNA ₃ ^{Lys} an benzylierter DEAE-Zellulose	8
2.1.3. Dritte Säulenchromatographie zur Reinigung von tRNA ₃ ^{Lys} auf RPC-5	9
2.2. Spaltung von tRNA ₃ ^{Lys} mit pankreatischer Ribonuklease und Charakterisierung der Fragmente	10
2.2.1. Präparative Spaltung von tRNA ₃ ^{Lys} mit pankreatischer Ribonuklease und Auftrennung der Fragmente durch Säulenchromatographie auf DEAE-Zellulose (DE-23) in 7 M Harnstoff	11
2.2.2. Identifizierung der pankreatischen Spaltstücke	12
2.3. Sequenzanalyse von tRNA ₃ ^{Lys} durch "in vitro" [³² P] -Markierung von Spaltprodukten	26

2.3.1.	Spaltung von tRNA ₃ ^{Lys} mit pankreatischer Ribonuklease und Auftrennung der 5'- [³² P] -markierten Fragmente mittels zweidimensionaler Hochspannungselektrophorese	26
2.3.2.	Sequenzanalyse der 5'- [³² P] -markierten pankreatischen Fragmente von tRNA ₃ ^{Lys}	27
2.4.	Partialspaltungen von tRNA ₃ ^{Lys}	30
2.4.1.	Mg ⁺⁺ -katalysierte alkalische Hydrolyse von tRNA ₃ ^{Lys} und Reinigung der entstandenen Fragmente durch Säulenchromatographie	30
2.4.2.	Ableitung der Sequenzen der Partialfragmente I C, I D, I E und III B	32
2.4.3.	[³² P] -Markierung am 3'-Ende von tRNA ₃ ^{Lys}	39
2.4.4.	Spaltung von tRNA ₃ ^{Lys} am m ⁷ G, Isolierung und Sequenzanalyse des kurzen Fragments	39
2.4.5.	Ableitung der Sequenz des Partialfragments IV D	42
2.4.6.	Partieller Abbau der C-C-A ^{OH} -Hälfte der tRNA ₃ ^{Lys} mit Schlangengiftphosphodiesterase	44
2.5.	Zusammenstellung der Sequenz von tRNA ₃ ^{Lys}	47
2.5.1.	Überlappende pankreatische und Ribonuklease T ₁ -Fragmente von tRNA ₃ ^{Lys}	47
2.5.2.	Verknüpfung der Partialfragmente I E, III B und IV D	48

2.6.	Das schwefelhaltige Nukleosid S im Anticodon und das fluoreszierende Nukleosid X neben dem 3'-Ende des Anticodons	51
2.6.1.	Identifizierung von 2-Thio-5-carboxymethyluridinmethylester in tRNA ₃ ^{Lys} aus Kaninchen- und Rattenleber	51
2.6.2.	Charakterisierung des fluoreszierenden Nukleosids X	57
3.	Diskussion der Ergebnisse	62
4.	Experimenteller Teil	69
4.1.	Material	
4.1.1.	Enzyme	
4.1.2.	Material für Säulenchromatographien	69
4.1.3.	Material für Dünnschichtchromatographien	70
4.1.4.	Nukleoside und Nukleotide	70
4.1.5.	Hochspannungselektrophorese	71
4.1.6.	Radioaktive Substanzen und Filme	
4.1.7.	Geräte	71
4.2.	Methoden	72
4.2.1.	Isolierung von tRNA aus Kaninchenleber	72
4.2.1.1.	Homogenisieren und Phenolisieren der Kaninchenleber	72
4.2.1.2.	Adsorption an DEAE-Zellulose	73
4.2.1.3.	Fraktionierte Fällung mit Isopropanol	74

4.2.2.	Ionenaustauscher für Säulenchromatographien	74
4.2.3.	Aminoacyl-tRNA-Synthetase aus Kaninchenleber und Prüfung auf Aminoacylierbarkeit von tRNA-Fraktionen	77
4.2.4.	Enzyme zum Spalten von tRNA in Mono- und Oligonukleotide	78
4.2.5.	Entsalzen von tRNA-Fragmenten	81
4.2.6.	Dünnschichtchromatographie auf Zelluloseplatten	81
4.2.7.	Vorversuche zur Sequenzierung der pankreatischen Fragmente	82
4.2.8.	Identifizierung von Mononukleotiden und Mononukleosiden	83
4.2.9.	Quantitative Analyse von Mono- und Oligonukleotiden	84
4.2.10.	Mg ⁺⁺ -katalysierte alkalische Hydrolyse von tRNA ₃ ^{Lys}	85
4.2.11.	Sequenzierung mit radioaktiven Arbeitstechniken	86
4.2.11.1.	Herstellung von γ -[³² P] -ATP	86
4.2.11.2.	Spalten von tRNA ₃ ^{Lys} mit Ribonuklease T ₁ oder pankreatischer Ribonuklease und anschließende enzymatische Abspaltung endständiger Phosphate	88

	Seite
4.2.11.3. 5'-[^{32}P] -Phosphorylierung der Oligo- nukleotide mit T_4 -Phagen-induzierter Polynukleotidkinase	89
4.2.11.4. Zweidimensionale Hochspannungselektro- phorese "Fingerprint"	90
4.2.11.5. Endgruppenbestimmung	91
4.2.11.6. Partieller Abbau von 5'-[^{32}P] -mar- kierten Oligonukleotiden mit Schlangen- giftphosphodiesterase	91
5. Zusammenfassung	93
6. Literaturverzeichnis	96
7. Lebenslauf	104

Abkürzungsverzeichnis :

DNA	Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
tRNA ^{Lys}	lysinakzeptierende Transfer-Ribonukleinsäure
DSC	Dünnschichtchromatographie
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TEAB	Triäthylammoniumbicarbonat
TCA	Trichloressigsäure
EDTA	Äthylendiamintetraacetat
UV	Ultraviolett
A ₂₆₀	Optische Dichte ("absorbance") bei der Wellenlänge 260 nm und bei 1 cm Schichtdicke
PPO	2,5 Diphenyloxazol
Cellosolve	Äthylenglykolmonoäthyläther
R _{Gp}	Quotient aus der chromatographischen Beweglichkeit eines Nukleotids und der von Gp
RF	Laufstrecke eines Nukleotids im Verhältnis zum Abstand der Lösungsmittelfront von der Startlinie.
Oligonukleotide:	Die Phosphodiesterbindungen wurden durch Striche dargestellt (A-G-Dp).

Nukleotide und Nukleoside:

3'- Nukleotide wurden durch Anhängen eines p an das Nukleosid bezeichnet, 5'- Nukleotide durch Vorstellen eines p .

A	Adenosin
U	Uridin
C	Cytidin
G	Guanosin
m ¹ A	1-Methyladenosin
m ² G	N ² - Methylguanosin
m ⁷ G	7- Methylguanosin
m ⁵ C	5- Methylcytidin
m ⁵ U= rT	Ribothymidin
Tm	2'-O- Methylribothymidin
ψ	Pseudouridin
D	Dihydrouridin
X	Nukleosid neben dem 3'- Ende des Anticodons von tRNA ^{Lys} ₃
m ⁵ s ² U	2-Thio-5-methyluridin
mcm ⁵ s ² U	2-Thio-5-carboxymethyluridinmethylester
mm ⁵ s ² U	2-Thio-5-(N-methylaminomethyl)uridin

1. Einleitung und Problemstellung

Der genetische Informationstransfer in der Zelle von der Desoxyribonukleinsäure (DNA) als Träger des Erbgutes über Ribonukleinsäure (RNA) auf die Proteine war schon Mitte der fünfziger Jahre allgemein anerkannt. Im Jahre 1958 veröffentlichte Crick diese Vorstellungen als " Zentrales Dogma der Molekulargenetik " (1) .

In der Zelle werden mindestens drei Klassen von RNAs von der DNA codiert. Nur die Boten-RNA (messenger-RNA=mRNA) kann ihre genetische Information auf Proteine weitergeben (2). Die ribosomale RNA (rRNA) bildet zusammen mit den ribosomalen Proteinen die beiden Untereinheiten des Ribosoms (3). Am Ribosom findet die Proteinbiosynthese statt.

Um die Ribonukleinsäuresequenz der Boten-RNA in die Aminosäuresequenz der Proteine zu übersetzen, postulierte Crick 1955 (4) kleine Adaptormoleküle, die durch spezifische Enzyme katalysiert eine bestimmte Aminosäure binden können. Die aminosäuretragenden Adaptormoleküle sollten auf der Boten-RNA eine spezifische Sequenzfolge, den genetischen Code (5), durch Wasserstoffbrückenbindung erkennen können. Die Adaptormoleküle mit den beschriebenen Eigenschaften wurden gefunden (6,7) und zunächst sRNA (=soluble RNA), später Transfer-RNA (=tRNA) genannt.

Die Polynukleotidketten der tRNAs sind ca.75 bis 93 Nukleotide lang, das entspricht etwa 25000 bis 30000 Dalton. Bis heute wurden etwa 70 tRNAs sequenziert, allerdings nur sehr wenige aus Säugetieren (8-11). Alle bisher aufgeklärten Primärstrukturen von tRNAs lassen sich zweidimensional als Kleeblatt darstellen, wenn man die höchstmögliche Anzahl von Basenpaaren bildet (Abbildung 1).

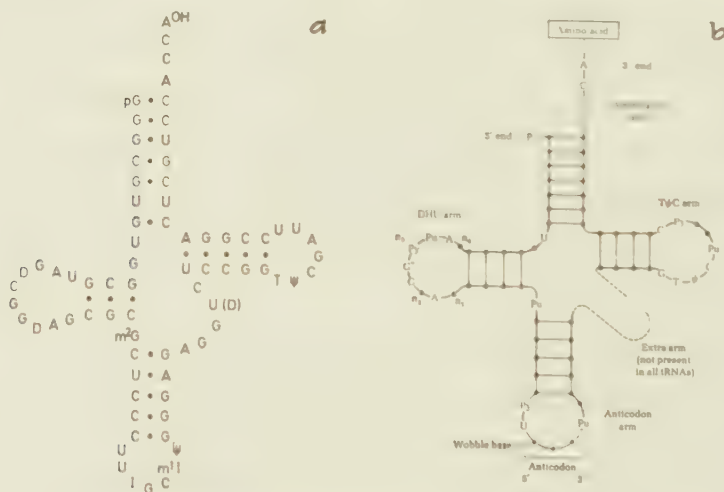


Abbildung 1: Kleeblattmodell (a) von tRNA₁^{Ala} aus Hefe nach Ref.12, korrigiert nach Ref.13, und (b) verallgemeinerte Kleeblattstruktur von tRNAs.

Pu=Purinnukleosid, Py=Pyrimidinnukleosid,
 Ψ =Pseudouridin, G^+ =Guanosin oder 2'-O-Methyl-
 guanosin, $n_1=0$ bis 1, $n_2=1$ bis 3, $n_3=1$ bis 3,

$n_4 = 1$ bis 2 Nukleoside in der Dihydrouridin-
(DHU-) Schleife.

Bis zu 20% der Nukleoside einer tRNA sind modifiziert, dabei sind Methylierungen am häufigsten. Auch die 2'-Hydroxylgruppe der Ribose kann methyliert sein. Der Grad der Modifizierung nimmt in der Evolution allgemein zu(14). Abbildung 1 zeigt die für fast alle tRNAs gültigen Gemeinsamkeiten wie die Anzahl der Basenpaare, die 3'-terminale CpCpA^{OH}-Sequenz, die Größe der Schleifen 2 und 4 und gleiche Nukleoside in bestimmten Positionen.

Die 2'- oder 3'-Hydroxylgruppe der Ribose des Adenosins am 3'-Ende jeder tRNA wird in einer hochspezifischen Reaktion mit einer der 20 Aminosäuren über eine energiereiche Esterbindung verknüpft. Diese Reaktion wird, wie von Crick postuliert, von einer bestimmten Aminoacyl-tRNA- Synthetase (15) katalysiert. Es ist noch nicht gelungen, den Mechanismus der Synthetase- tRNA- Erkennung (" 2.Genetischer Code ") aufzuklären. Dabei dürfte in erster Linie die Tertiärstruktur der tRNA entscheidend sein. Die tRNA transportiert ihre Aminosäure zum Ort der Proteinbiosynthese, zum Ribosomen- mRNA- Komplex, wo durch Wechselwirkung zwischen dem Codon der mRNA und dem Anticodon der tRNA die richtige Aminosäure an die wachsende Polypeptidkette angehängt wird.

Wenn zwei oder mehr verschiedene tRNAs mit der gleichen

Aminosäure beladen werden können, spricht man von isoakzeptierenden tRNAs. Für jede der 20 Aminosäuren steht fast ausnahmslos mehr als eine tRNA zur Verfügung. So enthält eine E.coli- Zelle etwa 80 verschiedene tRNA- Spezies. Nur ein Teil dieser " überschüssigen " tRNAs kann mit der Wobble- Hypothese (16) erklärt werden. Diese besagt, daß das 5'Nukleotid des Anticodons etwas aus seiner Position " herauswackeln " kann. Dadurch werden dort neben den normalen GC- und AU- Paaren auch GU- Paare ermöglicht. Inosin kann mit U, C und A ein Paar bilden. Es können also bis zu drei verschiedene Anticodons das gleiche Codon erkennen. Auch die Degeneration des genetischen Codes führt zu isoakzeptierenden tRNAs. Für eine Aminosäure stehen ein bis sechs Codons zur Verfügung. Diese unterscheiden sich meistens in der Base am 3'Ende des Codons.

Wegen der Vielfalt der isoakzeptierenden tRNA- Spezies wird schon seit langem über mögliche Funktionen von tRNAs außerhalb der Proteinbiosynthese diskutiert.

Lysinspezifische tRNAs mit einem Anticodon der Sequenz UUU, bzw. CUU sollten die Codons AAA und AAG erkennen.

In Säugerzellen wurde jedoch eine wesentlich höhere Zahl an lysinspezifischen tRNAs gefunden (17). Je nach Art der Analyse konnten bis zu sieben lysinakzeptierende Spezies unterschieden werden. Diese sind aus mehreren Gründen von besonderem Interesse:

a) Sie enthalten, wie Versuche von H.J.Gross (18) ergaben, kein Ribothymidin. Dieses ist in fast allen bekannten tRNAs in der Sequenz T^ψCG in Schleife 4 enthalten. Diese Sequenz ist verantwortlich für die Bindung der tRNA an das Ribosom während der Proteinbiosynthese (19-21).

b) Eine dieser lysinspezifischen tRNAs ist mit der Zellteilung assoziiert. Sie fehlt in solchen Geweben und Organen, die sich nicht teilen, während sie in Zellen, die sich teilen, in einer solchen Menge vorkommt, die der Zellteilungsrate proportional ist (22,23).

c) Schließlich ist kürzlich noch gezeigt worden, daß eine dieser lysinakzeptierenden tRNAs mit AM- Virus- RNA hybridisiert (24).

Es war daher im Rahmen dieser Arbeit die folgende Frage zu beantworten:

Welches Nukleosid nimmt in den lysinspezifischen tRNAs den Platz von Ribothymidin ein?

Um diese Frage zu beantworten, sollte eine der lysinspezifischen tRNAs aus Kaninchenleber sequenziert werden. Für die Sequenzierung einer Säuger- tRNA nach klassischen Verfahren (25) ist bei weitem mehr Material nötig, als verfügbar. (1 kg E.coli geben 2,5 g tRNA, 1 kg Leber liefern jedoch nur 400 mg unfraktionierte tRNA.)

Daher sollte neben der klassischen Sequenzierung ein neues Verfahren erprobt werden, die " fingerprint "-Technik

nach 5'-Phosphorylierung von Oligonukleotiden mit γ -[^{32}P]-ATP und T_4 - Phagen - induzierter Polynukleotidkinase. Die Methode wurde von Szekely und Sanger (26) beschrieben, aber nie konsequent für die Sequenzierung einer tRNA eingesetzt.

Die Sequenzanalyse der Spaltstücke nach Behandlung der tRNA mit Ribonuklease T_1 wurde von M.Raba durchgeführt und in seiner Dissertation beschrieben (27).

2. Ergebnisse

2.1. Isolierung von tRNA^{Lys}₃ aus Kaninchenleber- tRNA durch Säulenchromatographie.

2.1.1. Säulenchromatographie von Kaninchenleber- tRNA an DEAE- Sephadex A-50 (28).

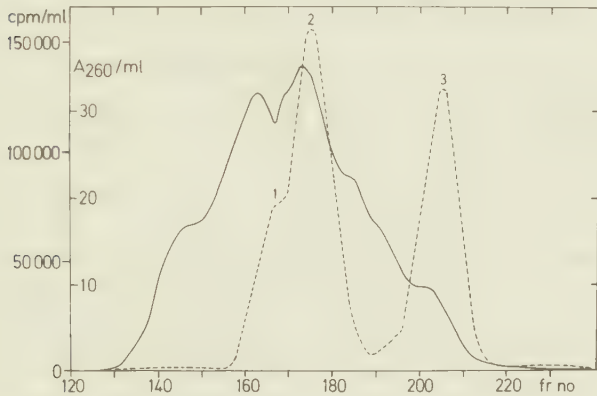


Abbildung 2: Säulenchromatographie von Kaninchenleber-
tRNA an DEAE- Sephadex A-50. Säule: 150x2 cm,
mit einem linearen Gradienten (in 0,02 M
Tris·HCl pH 7,5) von 0,31 M NaCl - 0,1 M
MgCl₂ (2,01) bis 0,41 M NaCl - 0,02 M MgCl
(2,01). Aufgetragen wurden 2g tRNA auf die
mit Startpuffer äquilibrierte Säule.
Elutionsgeschwindigkeit 5 sec/Tropfen, pro
Fraktion wurden 13ml gesammelt.
----TCA- fällbare cpm/ml nach Beladung mit
[³H]-Lysin (29).

Der Test auf Aminoacylierbarkeit mit [^3H]-Lysin ergab 3 Lysin- tRNA- Spezies, die in der Reihenfolge der Elution mit tRNA $^{\text{Lys}}_1$, tRNA $^{\text{Lys}}_2$ und mit tRNA $^{\text{Lys}}_3$ bezeichnet wurden. Die Fraktionen 198 bis 214 wurden vereinigt. Sie ergaben 2300 A_{260} - Einheiten.

2.1.2. Weitere Reinigung von tRNA $^{\text{Lys}}_3$ an benzoylierter DEAE- Zellulose (30).

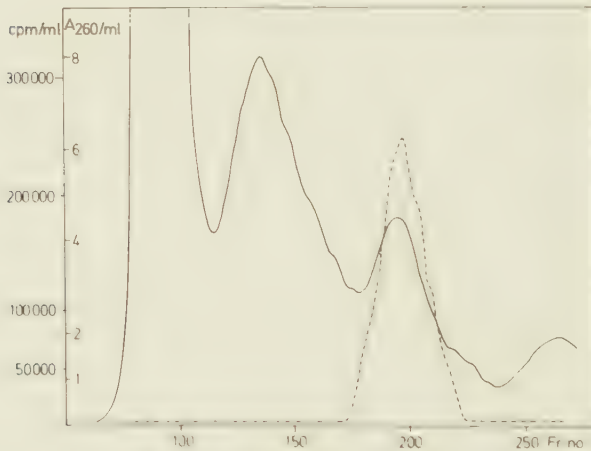


Abbildung 3: Säulenchromatographie an BD- Zellulose von 4800 A_{260} - Einheiten tRNA $^{\text{Lys}}_3$ aus der DEAE- Sephadex A-50-Chromatographie (Abb.2). Säule: 122x1,2cm, linearer Gradient von 0,45 M NaCl (600ml) bis 1 M NaCl - 10% Äthanol (600ml) in 0,01 M MgCl_2 ohne Puffer; Elutionsgeschwindigkeit 5 sec/Tropfen,

Fraktionsvolumen von 4ml bis 3,3ml abfallend wegen des Äthanolgradienten.

----TCA- fällbare cpm/ml nach Beladung mit [^3H]-Lysin.

Vereinigt und mit dem zweifachen Volumen Äthanol gefällt wurden die Fraktionen 185 bis 213. Es wurden 337 A_{260} -Einheiten erhalten.

Das zuerst eluierte Material ist ribosomale 5S-RNA. Wegen der Eigenschaft von BD- Zellulose, wenig modifizierte RNA schwächer zu binden, wird 5S-RNA fast nicht zurückgehalten. Nach dieser Chromatographie war die tRNA $^{\text{Lys}}_3$ schon etwa 85% rein.

2.1.3. Dritte Säulenchromatographie zur Reinigung von tRNA $^{\text{Lys}}_3$ auf RPC-5 (31,32). (Abbildung 4)

Es wurden die Fraktionen 129 bis 154 vereinigt. Sie ergaben 200 A_{260} -Einheiten reine tRNA $^{\text{Lys}}_3$.

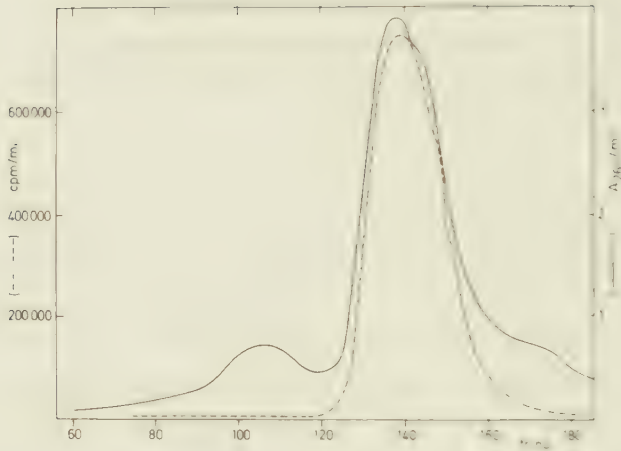


Abbildung 4: "Reversed phase" -Hochdruck- Säulenchromatographie (RPC-5).

Aufgetragen wurden 330 A_{260} -Einheiten; Säulenmaße 100 x 1,2cm; linearer Gradient von 0,4 M NaCl (200ml) bis 0,8 M NaCl (200ml) in folgendem Puffer: 0,01 M Natriumacetat pH 4,4, 0,01 M $MgCl_2$, 0,001 M Mercaptoäthanol, 0,01% Natriumazid; Elutionsgeschwindigkeit 2 sec/Tropfen, Druck 5 kg/cm^2 , Fraktionsvolumen 2,3ml.

---- TCA- fällbare cpm/ml nach Beladung mit $[^3H]$ -Lysin.

- 2.2. Spaltung von $tRNA_{3}^{Lys}$ mit pankreatischer Ribonuklease und Charakterisierung der Fragmente.

2.2.1. Präparative Spaltung von tRNA₃^{Lys} mit pankreatischer Ribonuklease und Auftrennung der Fragmente durch Säulenchromatographie auf DEAE- Zellulose (DE-23) in 7 M Harnstoff (33).

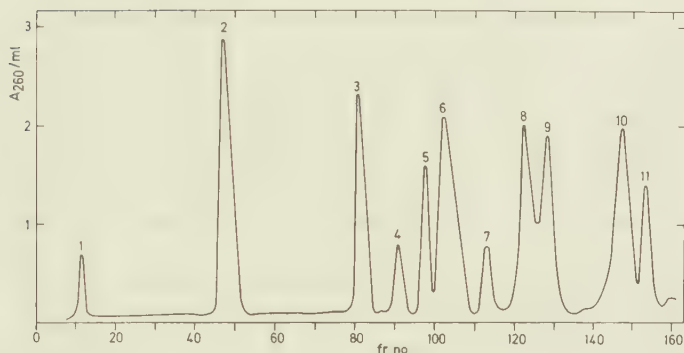


Abbildung 5: Säulenchromatographie an DEAE- Zellulose (DE-23) von 300 A₂₆₀- Einheiten tRNA₃^{Lys}, gespalten mit pankreatischer Ribonuklease. Säule: 140 x 0,6 cm; linearer Gradient von 0 bis 0,45 M NaCl (jeweils 800ml) in 7 M Harnstoff, 0,02 M Tris·HCl pH 7,5. Tropfgeschwindigkeit 5 sec/Tropfen, Fraktionsvolumen 4,3ml.

300 A₂₆₀- Einheiten tRNA₃^{Lys} wurden, wie unter "Methoden" beschrieben, mit pankreatischer Ribonuklease gespalten. Die Auftrennung der Mono- und Oligonukleotide auf der

Teniersäule (DEAE- Zellulose, 7 M Harnstoff, NaCl- Gradient) erfolgt in erster Linie nach Ladung (Kettenlänge), bei gleicher Ladung spielt auch die Basenzusammensetzung eine Rolle (Abb.5). Entsprechend dem Elutionsprofil wurden 11 Fraktionsbereiche isoliert und entsalzt (4.2.5).

2.2.2. Identifizierung der pankreatischen Spaltstücke.

Zuerst wurden die von 1 bis 11 nummerierten Fraktionen mit alkalischer Phosphatase inkubiert, um die 3'-Phosphate zu entfernen. Weil dadurch ein Oligonukleotid zwei negative Ladungen weniger besitzt, werden die RF- Werte in der Dünnschichtchromatographie erhöht. Die in einer Fraktion enthaltenen Oligonukleotide können jetzt in einem geeigneten Laufmittel besser voneinander getrennt werden.

Die isolierten Oligonukleotide wurden mit verschiedenen Enzymen in kleinere Fragmente bis zu den Mononukleotiden gespalten. Die Trennung und Reinigung der Spaltprodukte erfolgte wieder durch Dünnschichtchromatographie. Die Sequenz wurde abgeleitet durch Identifizierung und quantitative Analyse der Spaltprodukte, die mit den spezifisch spaltenden Enzymen erhalten wurden (Tabelle 1).

Fraktion 1: Adenosin

Diese Fraktion enthielt nur Adenosin vom 3'Ende der tRNA. Jede tRNA hatCpCpA^{OH} am 3'Ende und liefert nach

Spaltung mit pankreatischer Ribonuklease das Nukleosid Adenosin. Weil es bei pH 7,5 keine Ladung besitzt, wird es von der DEAE- Zellulose nicht zurückgehalten und daher mit der Front eluiert.

Fraktion 2: Up, Cp, m⁵Cp

Es wurden die Mononukleotide Cp und Up im Verhältnis 2:1 und m⁵Cp identifiziert. Letzteres wurde durch Dünnschichtchromatographie in den Laufmitteln A,B,C und durch die UV-Spektren identifiziert.

Fraktion 3: GpCp, GpUp, Ap ψ p

Nach Abspaltung der 3'Phosphate mit alkalischer Phosphatase waren nach DSC im Laufmittel C drei etwa gleichstarke Banden zu sehen (3A, 3B, 3C).

Spaltung mit Ribonuklease T₂ ergab Gp und C im molaren Verhältnis 1:1 für 3A, Gp und U im Verhältnis 1,2:1 für 3B und Ap und ψ im molaren Verhältnis 1,3:1 für 3C. Somit waren die drei Dinukleotide GpCp, GpUp und Ap ψ p in Fraktion 3 identifiziert(Molverhältnis untereinander = 1:1:0,8).

Fraktion 4: SpUp

Die Fraktion enthielt ein Dinukleotid. Nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase führte Ribonuklease T₂ nur in geringem Ausmaß zu einer Spaltung. Erst nach

Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase konnten pU und S im molaren Verhältnis 1:1 isoliert werden. Die Sequenz ist also SpU. Die Identifizierung des schwefelhaltigen Nukleosids S wird später beschrieben (2.6.1).

Fraktion 5: $\text{Apm}^1\text{ApGpUp}$

Die Sequenz des Oligonukleotids wurde folgendermaßen bewiesen: Nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase und Ribonuklease T_1 -Spaltung entsteht das Nukleosid U. Daher muß die Sequenz auf GpUp enden. Eine Ribonuklease T_2 -Spaltung des Oligonukleotids Am^1ApGp aus der Ribonuklease T_1 -Spaltung brachte $\text{Ap}, \text{m}^1\text{Ap}$ und Gp. Die Entscheidung, ob Ap oder m^1Ap in der Sequenz links steht, ergab eine Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase: A entsteht als Nukleosid und steht daher am 5'Ende des Tetranukleotids. Die quantitative Analyse bestätigte die Sequenz, d.h. die vier Spaltprodukte $\text{A}, \text{pm}^1\text{A}, \text{pG}, \text{pU}$ standen im gleichen Molverhältnis zueinander.

Obwohl es sich um ein Tetranukleotid handelt, wurde das Oligonukleotid im Bereich der Trinukleotide eluiert. Der Grund dafür ist, daß m^1A eine positive Ladung trägt.

Fraktion 6: $\text{GpGpDp}, \text{ApGpDp}, \text{Apm}^2\text{GpCp}$

Zuerst wurden die 3'Phosphate mit alkalischer Phosphatase abgespalten. Durch DSC in Laufmittel C konnten die drei

Oligonukleotide voneinander getrennt werden.

GpGpD lieferte nach Ribonuklease T_1 - Spaltung nur Gp. Da rechts immer ein Pyrimidin stehen muß, konnte nur Dihydro-uridin (D) vorliegen, das unter UV- Licht keine Absorption zeigt. Nachgewiesen wurde D auf der DC- Platte durch Besprühen zuerst mit 0,1 M KOH und anschließend mit Ehrlichs Reagenz (34). An der Stelle, wo sich D befand, zeigte sich ein gelber Fleck. Ein weiterer Nachweis wurde in Lösung durchgeführt: Dem intakten Trinukleotid wurde 1/10 Volumen 1 M KOH zugegeben. Danach war ein für D typischer Anstieg und daraufhin ein langsamer Abfall der Absorption bei 230nm zu beobachten (35). Eine Spaltung des Trinukleotids mit Schlangengiftphosphodiesterase führte zu G und pG im Verhältnis 1:1. pD wurde mit Ehrlichs Reagenz auf der Dünnschichtplatte nachgewiesen.

ApGpD war nach Spaltung mit Ribonuklease T_1 zu ApGp und D und anschließender Spaltung des Dinukleotids ApGp sequenziert. Die Nachweise für D waren positiv. Ap und Gp lagen im Molverhältnis 1:1 vor.

Das dritte Trinukleotid enthielt das methylierte Nukleosid N^2 - Methylguanosin (m^2G). Spaltung mit Ribonuklease T_1 ergab Apm^2Gp und C, Spaltung mit Ribonuklease T_2 von Apm^2Gp lieferte die Nukleotide Ap und m^2Gp . Mit alkalischer Phosphatase wurde das 3'Phosphat von dem seltenen Nukleotid entfernt. In den Laufmitteln B,C und D wurde gezeigt,

daß m^2G identisch mit authentischem Material ist. Die UV-Spektren bei pH 2, 7 und 12 entsprachen ebenfalls den Literaturspektren.

Nach der Auftrennung der drei Trinukleotide wurde durch Messung der UV-Absorption bei 260nm und mit Hilfe der Sequenzen ermittelt, daß die drei Trinukleotide im Verhältnis 1:1:1 vorliegen.

Fraktion 7: XpAp ψ p

Das 3'Phosphat wurde mit alkalischer Phosphatase abgespalten. Nach DSC in Laufmittel C war unter UV-Licht eine hellblau fluoreszierende Bande zu sehen. Fraktion 7 enthielt daher nur ein Oligonukleotid. Das hellblaue Leuchten unterschied sich in seinem Farbton deutlich von dem der Guanosinderivate.

Eine Spaltung mit Ribonuklease T_2 führte zur Identifizierung von ψ , das als Pyrimidinnukleosid rechts stehen muß. Daneben erhielten wir fast ausschließlich XpAp, nur in geringem Ausmaß wurde vollständig durchgespalten zu Xp und Ap. Das Dinukleotid wurde mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und das entstandene Dinukleosidphosphat durch DSC gereinigt. Ein Aliquot von XpA wurde erneut mit Ribonuklease T_2 inkubiert. Es wurde wieder nur geringfügige Spaltung beobachtet. Ein weiteres Aliquot konnte mit Schlangengiftphosphodiesterase vollständig zu X und pA gespalten werden. Um zu zeigen, daß es sich bei

dem entstandenen X um ein Nukleosid handelt, wurde es auf einer DC- Platte in Laufmittel D chromatographiert. In diesem Laufmittel haben Nukleotide einen sehr geringen RF- Wert. Der RF- Wert von X war 0,62. Es ist daher ein Nukleosid. Eine weitere Spaltung von XpAp ψ mit Ribonuklease T₂, aber mit doppelter Enzymmenge, führte zu einer fast vollständigen Spaltung zu Xp, Ap und ψ . Für pA und p ψ war das Molverhältnis 1:0,8. (Quantitative Bestimmungen von ψ fallen meist etwas zu niedrig aus.) Aus den gemessenen A₂₆₀- Einheiten von X und pA und dem bekannten ϵ_{260} für A=15,0x10³ wurde für das Nukleosid X ein ϵ_{260} = 11,7x10³ berechnet. Voraussetzung ist, daß X und pA im Verhältnis 1:1 vorliegen.

Weitere Versuche zur Charakterisierung des Nukleosids X werden später beschrieben (2.6.2).

Die oben erarbeiteten Daten sind nur mit einer Sequenz XpAp ψ vereinbar.

Fraktion 8: pGpCp, GpGpApUp

Nach Abspalten der endständigen Phosphate mit alkalischer Phosphatase war nach DSC in Laufmittel C ein Oligonukleotid sehr weit gelaufen, das andere war nahe der Startlinie geblieben. Eine Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase ergab bei dem Oligonukleotid mit dem hohen RF- Wert G und pC im Molverhältnis 1:1, ebenso lieferte die Ribonuklease T₂- Spaltung Gp und C im Verhältnis 1:1. Vor der Behandlung

mit alkalischer Phosphatase war das Dinukleotid nicht mit authentischem GpCp (aus Fraktion 3) identisch, es hatte in Laufmittel C einen geringeren RF-Wert. Eine Spaltung des Oligonukleotids mit Ribonuklease T_1 lieferte pGp und Cp im Molverhältnis 1:1. Damit war die Sequenz pGpCp gesichert. Dieses Dinukleotid wird mit den Tetranukleotiden von der Tenersäule eluiert, weil es vom 5'Ende der tRNA stammt und sowohl am 3' als auch am 5'Ende eine Phosphatgruppe besitzt. Die Tenersäule trennt Oligonukleotide vornehmlich nach der Zahl der Ladungen. Die Phosphatgruppe am 5'Ende gibt dem Dinukleotid zwei zusätzliche negative Ladungen.

Das Tetranukleotid GpGpApU wurde zuerst mit Ribonuklease T_1 gespalten. Diese ergab Gp und ApU im Verhältnis 2:1. ApU wurde durch Spaltung mit Ribonuklease T_2 charakterisiert (Ap+U). Eine Spaltung mit Schlagengiftphosphodiesterase lieferte G,pG,pA und pU im Molverhältnis 1:1:1:1. Die Sequenz des Tetranukleotids ist also GpGpApU.

Fraktion 9: GpGpGpCp, ApGpApCp

Mit alkalischer Phosphatase wurde das 3'Phosphat abgespalten. Nach DSC in Laufmittel C konnten die zwei Oligonukleotide isoliert werden. Eine Spaltung des einen Oligonukleotids mit Ribonuklease T_2 ergab Gp und C im Verhältnis 2,5:1. Eine Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase

ergab G,pG und pC im Molverhältnis 1:2:1, es mußte also die Sequenz GpGpGpC vorliegen.

Das zweite Oligonukleotid lieferte nach Spaltung mit Ribonuklease T_1 die beiden Dinukleotide ApGp und ApC, deren Sequenz durch eine Spaltung mit Ribonuklease T_2 festgelegt wurde. Die quantitativen Verhältnisse waren jeweils 1:1; somit war die Sequenz ApGpApC erwiesen.

Fraktion 10: GpApGpGpm⁷GpDp, ApGpApGpCp

Nach Abspaltung der 3'Phosphate mit alkalischer Phosphatase wurden durch DSC die zwei Oligonukleotide der Fraktion aufgetrennt. Die beiden unter UV- Licht sichtbaren Banden waren etwa gleich stark. Zuerst wurde das Oligonukleotid mit dem kleineren RF- Wert sequenziert: Eine Spaltung mit Ribonuklease T_1 lieferte 2 Gp,ApGp und m⁷GpD. ApGp wurde durch Spaltung mit Ribonuklease T_2 charakterisiert. Im zweiten Dinukleotid war wegen der alkalischen Laufmittel das m⁷G nicht mehr intakt, es konnte aber durch die UV- Spektren seines Zerfallsproduktes identifiziert werden. Weil Dihydrouridin keine UV- Absorption hat, war dazu keine weitere Spaltung nötig. D wurde im Dinukleotid durch den Anstieg der Absorption bei 230nm und deren langsame Abnahme nachgewiesen (35). Um die Lage der beiden Gp zu bestimmen, wurde zuerst mit Schlangengiftphosphodiesterase gespalten. Als Nukleosid konnte G identifiziert werden, d.h. die Sequenz muß mit Gp beginnen.

Das zweite Gp konnte jetzt vor oder nach ApGp stehen.

Eine Spaltung des Oligonukleotids mit Polynukleotidphosphorylase sollte diese Frage klären. Die Produkte dieser Spaltung wurden durch DSC in Laufmittel D in drei Banden aufgetrennt. Die am weitesten gelaufene Bande wurde nach Elution geteilt und zur Hälfte mit Ribonuklease T_2 gespalten. Es ergab sich Gp und A. Die andere Hälfte wurde mit Schlangengiftphosphodiesterase gespalten und lieferte G und pA. Die quantitativen Verhältnisse waren jeweils 1:1. Mit dem Dinukleotid GpA am 5'Ende ist die Sequenz eigentlich schon festgelegt; das zweite Gp aus der Spaltung mit Ribonuklease T_1 kann nur noch nach ApGp stehen. Die unterste Bande nach DSC der Spaltung mit Polynukleotidphosphorylase wurde als GpApG vom 5'Ende der Sequenz identifiziert. Eine Spaltung mit Ribonuklease T_1 ergab Gp und ApG im Molverhältnis 1:1. ApG wurde noch mit Ribonuklease T_2 gespalten (Ap+G).

Die mittlere Bande enthielt die abgespaltenen 5'Mononukleotiddiphosphate. Nach Behandlung mit alkalischer Phosphatase wurden G und m^7G nachgewiesen.

Sequenz: GpApGpGpm⁷GpD.

Das Hexanukleotid wird von der Tenersäule zusammen mit einem Pentanukleotid eluiert, weil m^7G eine positive Ladung trägt und damit eine negative Ladung der Phosphate neutralisiert.

Das zweite Oligonukleotid der Fraktion 10 wurde mit Ribo-

nuklease T_1 gespalten. Nach DSC in Laufmittel C wurden ApGp und C im Molverhältnis 1,7:1 isoliert. Für das Penta-nukleotid ist dann nur die Sequenz ApGpApGpC möglich.

Fraktion 11: ApGpGpGpTm ψ p

Aus dem Elutionsprofil der Tenersäule war schon ersichtlich, daß Fraktion 11 nur ein Oligonukleotid enthalten kann, da mit Fraktion 11 weniger A_{260} -Einheiten eluiert wurden als mit Fraktion 10.

Ohne vorher mit alkalischer Phosphatase das 3'Phosphat abzuspalten, wurde mit Ribonuklease T_1 inkubiert. Nach DSC in Laufmittel B waren 2 Banden zu erkennen: Beide Banden wurden eluiert und mit alkalischer Phosphatase behandelt. Die eine Bande ergab nach DSC (Laufmittel C) G und ApG im Verhältnis 2,2:1. Die zweite Bande wurde 24 h mit Schlangengiftphosphodiesterase gespalten, dann konnte Tm und p ψ identifiziert werden. Das 5'Ende des Oligonukleotids bildet demnach Tm ψ p.

Eine Behandlung des Oligonukleotids mit alkalischer Phosphatase und danach mit Schlangengiftphosphodiesterase liefert als Nukleosid A, das in der Sequenz links stehen muß. Damit ist die Sequenz ApGpGpGpTm ψ p bewiesen.

Das Dinukleotid Tm ψ p mußte 24 Stunden lang mit Schlangengiftphosphodiesterase inkubiert werden, weil ψ die Spaltung hemmt. Eine Spaltung mit Ribonuklease T_2 ist nicht möglich, da bei Tm die Ribose methyliert ist. Ribonuklease T_2 , T_1

und pankreatische Ribonuklease spalten über zyklische 2',3'-Phosphat- Zwischenstufen, die in diesem Fall nicht möglich sind.

Die Identität von 2'-O- Methylribothymidin wurde von M.Raba in seiner Dissertation (27) bewiesen. Er synthetisierte 2'-O- Methylribothymidin und konnte durch Vergleich von UV- Spektren (Abbildung 6), Massenspektren und durch Dünnschichtchromatographien in verschiedenen Laufmitteln die Identität zeigen.

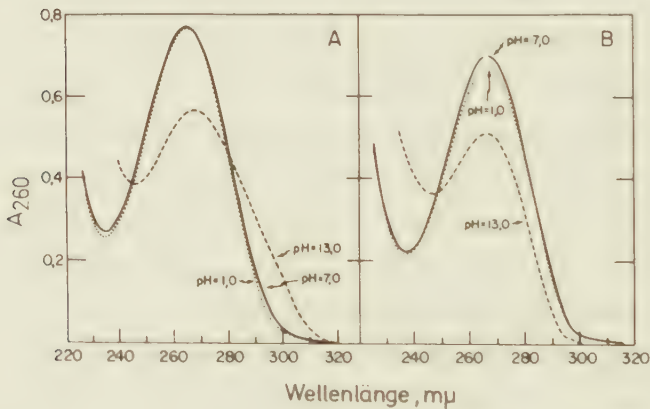


Abbildung 6: UV- Spektren von synthetisiertem 2'-O-Ribothymidin (A) und 2'-O-Ribothymidin aus tRNA^{Lys}₃ (B) bei pH 1,7 und 13.

Tabelle 1:

Fraktion	Methoden	Spaltprodukte	Sequenz
1			A
2 A B C			Cp Up m^5Cp
3 A B C	P, T_2 P, T_2 P, T_2	Gp, U Gp, C Ap, ψ	GpUp GpCp Ap ψ p
4	P, T_2, T_1 P, SG	SpU S, pU	SpUp
5	P, T_1 aT_2 P, SG	Apm ¹ ApGp ^a , U Ap, m ¹ Ap, Gp A, pm ¹ A, pG, pU	Apm ¹ ApGpUp
6 A B C	P, T_1 P, SG P, T_1 aT_2 P, T_1 aT_2 aSG	Gp, D G, pG, pD ApGp ^a , D Ap, Gp Apm ² Gp ^a , C Ap, m ² Gp A, pm ² G	GpGpDp ApGpDp Apm ² GpCp

Fortsetzung Tabelle 1:

Fraktion	Methoden	Spaltprodukte	Sequenz
7	P, T ₂ aP, SG P, T ₂ ⁺ P, SG	XpAp ^a , Ψ X, pA Xp, Ap, Ψ X, pA, p Ψ	XpAp Ψ p
8 A B	P, T ₁ aT ₂ P, SG P, T ₂ T ₁ P, SG	2Gp, ApU ^a Ap, U G, pG, pA, pU Gp, C pGp, Cp G, pC	GpGpApUp pGpCp
9 A B	P, T ₂ P, SG P, T ₁ aT ₂ bT ₂	3Gp, C G, 2pG, pC ApGp ^a , ApC ^b Ap, Gp Ap, C	GpGpGpCp ApGpApCp
10 A	P, T ₁ aT ₂ P, PNP aT ₁ fT ₂	ApGp ^a , 2Gp, m ⁷ GpD Ap, Gp GpApG ^a , GpA ^b , ppG ^c , ppD ^d , ppm ⁷ G ^e Gp, ApG ^f Ap, G	

Fortsetzung Tabelle 1:

Fraktion	Methoden	Spaltprodukte	Sequenz
10 B	^b T ₂	Gp, A	GpApGpGp ⁷ GpDp
	^b SG	G, pA	
	c, d, e _P	G, m ⁷ G, D	
	P, T ₁	2ApGp ^a , C	
	^a T ₂	Ap, Gp	
11	T ₁	ApGp ^a , 2Gp, Tmp ^b p ^b	ApGpGpGpTm ^b p
	^a T ₂	Ap, Gp	
	^b P, SG ⁺	Tm, p ^b	
	P, SG ⁺	A, 3pG, pTm, p ^b	

P= Spaltung mit alkalischer Phosphatase

T₁= Spaltung mit Ribonuklease T₁

T₂= Spaltung mit Ribonuklease T₂

SG= Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase (Inkubationszeit 5h)

SG⁺= Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase (Inkubationszeit 24h)

T₂⁺= Spaltung mit Ribonuklease T₂ (doppelte Enzymmenge)

PNP= Spaltung mit Polynukleotidphosphorylase

Tabelle 1: Zusammenstellung der pankreatischen Fragmente von tRNA₃^{Lys} und der enzymatischen Spaltmethoden, die zur Sequenzaufklärung führten.

2.3. Sequenzanalyse von tRNA^{Lys}₃ durch "in vitro" [³²P] - Markierung von Spaltprodukten.

2.3.1. Spaltung von tRNA^{Lys}₃ mit pankreatischer Ribonuklease und Auftrennung der 5'- [³²P] - markierten Fragmente mittels zweidimensionaler Hochspannungselektrophorese (36-40, Abb.7).



Abbildung 7: Autoradiographie einer zweidimensionalen Hochspannungselektrophorese ("Fingerprint"). Nach Spaltung von tRNA^{Lys}₃ mit pankreatischer Ribonuklease und nach Abspalten der 3'- Phos-

phate mit alkalischer Phosphatase wurden die Fragmente am 5'-Ende mit [^{32}P] -Phosphat markiert.

1= Erste Dimension auf Zelluloseacetatfolie in 5% Eisessig/Pyridin pH 3,5 in 7 M Harnstoff.

2= Zweite Dimension auf DEAE- Papier in 7% Ameisensäure (1mM EDTA).

B= Blauer Farbstoff "Xylene Cyanol FF"

G-6-P= Glukose-6-phosphat

16= Artefakt

2.3.2. Sequenzanalyse der 5'- [^{32}P] - markierten pankreatischen Fragmente von tRNA^{Lys}₃ (38).

Die markierten Oligonukleotide wurden auf dem "Fingerprint" (Abb.7) angezeichnet, numeriert, ausgeschnitten und eluiert. Durch Messung der Cerenkow- Strahlung der isolierten Fragmente wurde gezeigt, daß bis auf eines (pG-C), das doppelte Aktivität zeigte, alle Oligonukleotide nur einmal in der Sequenz vorkamen. Die Fragmente wurden dann mit Schlangengiftphosphodiesterase vom 3'- Ende her sequentiell abgebaut und auf DEAE- Papier aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte mittels Hochspannungselektrophorese. Die durch Autoradiographie sichtbaren Abbauprodukte unterscheiden sich jeweils um ein Nukleotid vom 3'- Ende. Mit Hilfe der "M"- Werte (4.2.11.6) konnten die vom 3'- Ende nacheinander abgebauten Nukleotide identifiziert werden (Abb.8,9).

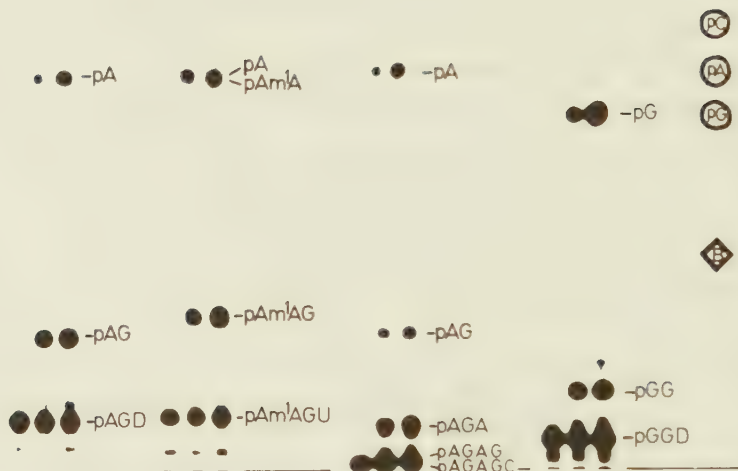


Abbildung 8: Autoradiographie eines sequentiellen Abbaus von 5'-[^{32}P]-markierten Oligonukleotiden mit Schlangengiftphosphodiesterase. Auf DEAE-Papier wurden links jeweils das intakte Oligonukleotid, daneben nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Schlangengiftphosphodiesterase die Abbauprodukte aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte durch Hochspannungselektrophorese in 5% Eisessig/Pyridin pH 3,5. Das jeweils abgebaute Nukleotid wurde mit Hilfe der "M"-Werte ($M = \frac{x}{y}$; 4.2.11.6) identifiziert.

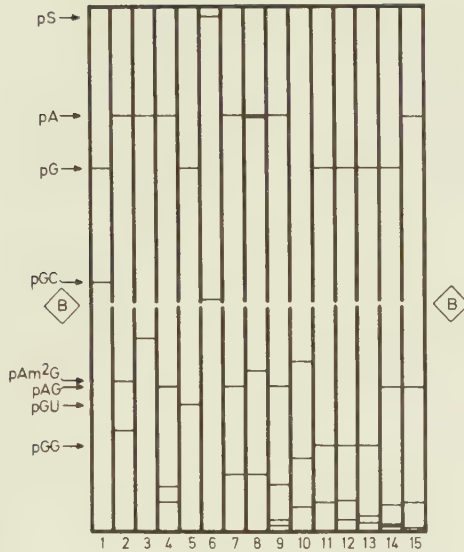


Abbildung 9: Schematische Darstellung des sequentiellen Abbaus der 5'-[³²P]-markierten pankreatischen Fragmente von tRNA^{Lys}₃. Als Striche wurden die Oligonukleotide und deren Abbau-
produkte durch Schlangengiftphosphodiesterase eingezeichnet (vgl. Abb. 8). Die Auftrennung erfolgte durch Hochspannungselektrophorese auf DEAE- Papier in 5% Eisessig/Pyridin pH 3,5.
1= pG-C; 2= pA-m²G; 3= pA-ψ; 4= pA-G-A-C;
5= pG-U; 6= pS-U; 7= pA-G-D; 8= pA-m¹A-G-U;
9= pA-G-A-G-C; 10= pX-A-ψ; 11= pG-G-D;
12= pG-G-A-U; 13= pG-G-G-C; 14= pG-A-G-G-m⁷G-D;
15= pA-G-G-G-Tm-ψ.

2.4. Partialsplaltungen von tRNA₃^{Lys}.

2.4.1. Mg⁺⁺- katalysierte alkalische Hydrolyse von tRNA₃^{Lys} (41) und Reinigung der entstandenen Fragmente durch Säulenchromatographie (Abb.10,11).

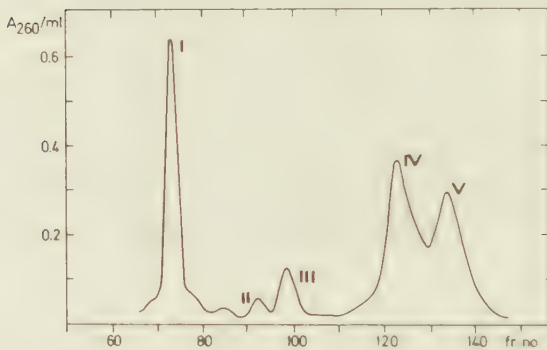


Abbildung 10: Säulenchromatographie an DEAE-(DE 23-) Zellulose zur Auftrennung von 50 A_{260} -Einheiten Mg⁺⁺- katalysiert durch alkalische Hydrolyse gesplattene tRNA₃^{Lys}. Säule 140cm x 0,45cm; linearer Gradient von 0 bis 0,5 M NaCl (je 700ml) in 7 M Harnstoff pH 3,0; Tropfgeschwindigkeit 18 sec; 4,8ml pro Fraktion wurden gesammelt.

Es wurden die Fraktionsbereiche

I: Fr. 72 bis 75 mit 8,2 A_{260} - Einheiten

II: Fr. 91 bis 93 mit 0,75 A_{260} - Einheiten

III: Fr. 97 bis 101 mit 2,5 A_{260} - Einheiten

IV : Fr. 120 bis 128 mit 12,5 A_{260} - Einheiten

V : Fr. 130 bis 140 mit 9,8 A_{260} - Einheiten

gesammelt, entsalzt und zur Rechromatographie auf eine DEAE- (DE 23-) Zellulose- Säule in 7 M Harnstoff, diesmal jedoch bei pH 7,5, aufgetragen (Abb.11).

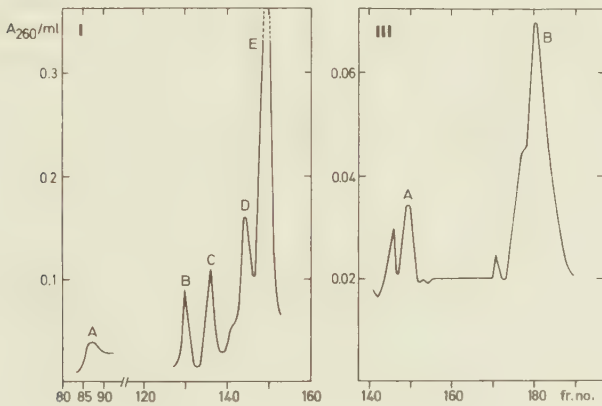


Abbildung 11a: Rechromatographien der Fraktionsbereiche I und III (Abb.10) durch Säulenchromatographie an DEAE- Zellulose. Säulenmaße 140cm x 0,45cm; lineare Gradienten von 0 bis 0,45 M NaCl (je 400ml) in 0,02 M Tris-HCl pH 7,5 und in 7 M Harnstoff.

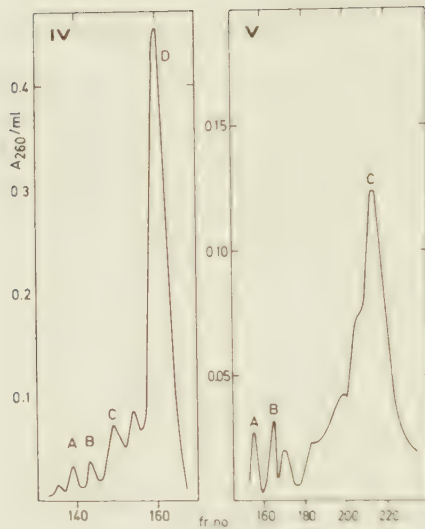


Abbildung 11b: Rechromatographien der Fraktionsbereiche IV und V (Abb.10) durch Säulenchromatographie an DEAE- Zellulose. Säulenmaße 140cm x 0,45cm; lineare Gradienten von 0 bis 0,45 M NaCl (je 400ml) in 0,02 M Tris.HCl pH 7,5 und in 7 M Harnstoff.

Es wurden die Fraktionsbereiche IA, IB, IC, ID, IE, IIIA, IIIB, IVA, IVB, IVC, VA, VB, VC gesammelt und entsalzt. Der Fraktionsbereich II (Abb.10) konnte nach Rechromatographie nicht mehr identifiziert werden.

2.4.2. Ableitung der Sequenzen der Partialfragmente IC, ID, IE und IIIB.

Die erhaltenen Fragmente wurden jeweils mit Ribonuklease T₁, bzw. mit pankreatischer Ribonuklease gespalten. Nach

Behandlung mit alkalischer Phosphatase wurden die Oligonukleotide am 5'-Ende mit [^{32}P] - Phosphat markiert. Die Auswertung der "Fingerprints" nach Spaltung der Fragmente mit Ribonuklease T_1 wird in der Dissertation von M.Raba (27) beschrieben. Von den "Fingerprints" nach Spaltung mit pankreatischer Ribonuklease wurden die Fragmente IC, ID, IE, IIIB und IVD für die Zusammenstellung der gesamten Sequenz der tRNA^{Lys}₃ verwendet.

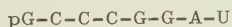
Die Sequenzen der pankreatischen bzw. Ribonuklease T_1 -Spaltstücke eines Fragments wurden durch sequentiellen Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase abgeleitet (vgl. Abb. 8).

Fragment IC (Abb. 12)

Nach Spaltung mit Ribonuklease T_1 und mit pankreatischer Ribonuklease wurden folgende Oligonukleotide gefunden:

RNase T_1 (27)	pankr. RNase
pC-C-C-G	pG-C
pA-U	pG-G-A-U

Das Dinukleotid pA-U konnte, da es als T_1 -Fragment kein G am 3'-Ende hat, nur das 3'-Ende des Fragments sein. Am 5'-Ende von pG-G-A-U mußte ein T_1 -Fragment anschließen, nämlich pC-C-C-G. Das Dinukleotid pG-C konnte daher nur noch den Anfang der Sequenz am 5'-Ende bilden:



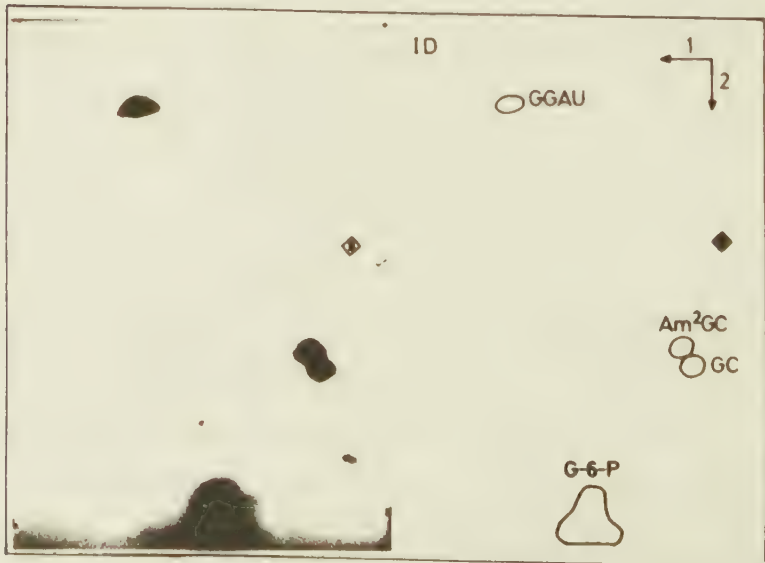
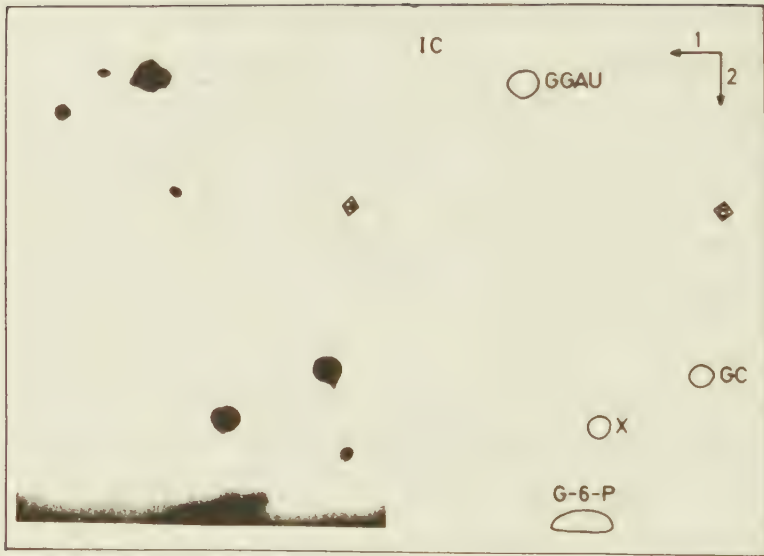




Abbildung 12: Autoradiographien zweidimensionaler Hochspannungselektrophoresen ("Fingerprints") der Fragmente IC, ID, IE nach Spaltung mit pankreatischer Ribonuklease, Abspalten der 3'- Phosphate mit alkalischer Phosphatase und 5'- [^{32}P] - Markierung der Oligonukleotide.

1= Erste Dimension auf Zelluloseacetatfolie in 5% Eisessig/Pyridin pH 3,5 in 7 M Harnstoff.

2= Zweite Dimension auf DEAE- Papier in 7% Ameisensäure (1mM EDTA), X= Artefakt

Fragment ID (Abb.12)

Die Spaltung des Fragments mit Ribonuklease T_1 und pankreatischer Ribonuklease ergab folgende Oligonukleotide:

RNase T ₁ (27)	pankr. RNase
(a) pC-C-C-G	(c) pG-C
(b) pA-U-A-m ² G	(d) pA-m ² G-C
	(e) pG-G-A-U

Da m²G in der tRNA₃^{Lys} nur einmal gefunden wurde, konnte an (b) nur (d) anschließen:



Das Pentanukleotid konnte nur am 5'-Ende entsprechend dem Fragment IC fortgesetzt werden, da die Sequenzen -A-U- und C-C-C-G in der tRNA₃^{Lys} nur einmal vorkommen:



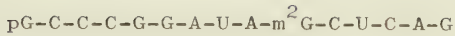
Fragment IE (Abb.12)

Die enzymatischen Spaltungen ergaben folgende Oligonukleotide:

RNase T ₁ (27)	pankr. RNase
pC-C-C-G	pG-C
pA-U-A-m ² G	pG-G-A-U
pC-U-C-A-G	pA-m ² G-C
	pA-G

Wie ein Vergleich zeigte, waren die Oligonukleotide aus dem Fragment ID im Fragment IE enthalten. Neu hinzugekommen waren nur pC-U-C-A-G und pA-G. Das pankreatische Fragment pA-G mußte das 3'-Ende bilden.

pC-U-C-A-G mußte am 3'-Ende des Fragments ID eingesetzt werden, weil nur dann nach Spaltung mit pankreatischer Ribonuklease das Dinukleotid pA-G erhalten wird.



Fragment IIIB (Abb.13)

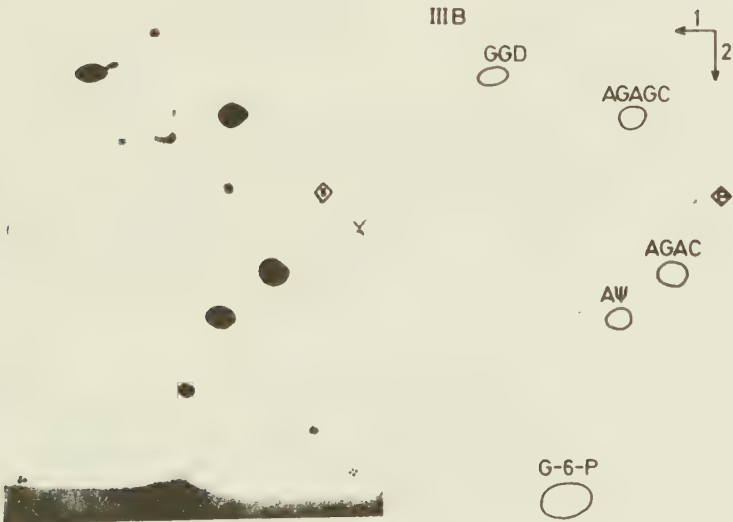


Abbildung 13: Autoradiographie einer zweidimensionalen Hochspannungselektrophorese ("Fingerprint") des Fragments IIIB nach Spaltung mit pankreatischer Ribonuklease, Abspalten der 3'- Phosphate mit alkalischer Phosphatase und 5'- [^{32}P] - Markierung der Oligonukleotide.
1= Erste Dimension auf Zelluloseacetatfolie in 5% Eisessig/Pyridin pH 3,5 in 7 M Harnstoff
2= Zweite Dimension auf DEAE- Papier in 7% Ameisensäure (1mM EDTA).

Nach Spaltung mit Ribonuklease T_1 und mit pankreatischer Ribonuklease wurden folgende Oligonukleotide identifiziert:

RNase T ₁ (27)	pankr. RNase
pD-C-G	pA-Ψ
pD-A-G	pA-G-A-G-C
pA-G	pG-G-D
pC-A-Ψ-C-A-G	pA-G-A-C
pA-C-U-S-U-U	

Das Ribonuklease T₁-Spaltstück pA-C-U-S-U-U (ohne 3'-G) mußte im Fragment IIIB das 3'- Ende bilden. Dieses Oligonukleotid verlangte am 5'- Ende ein pankreatisches Fragment mit-A-C am 3'- Ende. Dafür kam nur pA-G-A-C in Frage:

(a) pA-G-A-C-U-S-U-U

Das Ribonuklease T₁ - Fragment pD-C-G verlangt, da es nicht mehr am 3'- Ende des Fragments IIIB stehen kann, ein pankreatisches Fragment, das mit pG... beginnt. Dafür kommt nur pG-G-D in Frage:

pD-C-G-G-D

Das Trinukleotid pD-A-G mußte dann als einziges noch übriggebliebenes Oligonukleotid mit einem Dihydrouridin die Sequenz auf der rechten Seite fortsetzen:

(b) pD-C-G-G-D-A-G

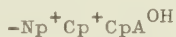
Jetzt waren nur noch pA-Ψ, pA-G, pA-G-A-G-C und pC-A-Ψ-C pC-A-Ψ-C-A-G noch nicht in die Sequenz eingefügt. Die beiden Dinukleotide sind schon in den beiden längeren Oligonukleotiden enthalten. pA-G-A-G-C und pC-A-Ψ-C-A-G konnten nur in dieser Reihenfolge das 3'- Ende von (b) fortsetzen. Das 3'- Ende des Fragments IIIB bildet, wie

gezeigt wurde, das Oktanukleotid (a):

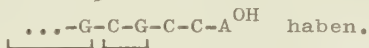
pD-C-G-G-D-A-G-A-G-C-A- Ψ -C-A-G-A-C-U-S-U-U

2.4.3. [^{32}P] - Markierung am 3'- Ende von tRNA₃^{Lys}
(42, Abb. 17 E)

Das -C-C-A^{OH}- Ende der tRNA₃^{Lys} wurde durch kontrollierte Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase abgespalten. Mit tRNA- Nukleotidyltransferase, α - [^{32}P] - CTP und ATP wurde die tRNA₃^{Lys} wieder repariert. Damit waren zwei [^{32}P] - markierte Phosphate in die tRNA eingebaut:



Nach Spaltung von tRNA₃^{Lys} mit Ribonuklease T₁ wurden die radioaktiven Spaltstücke Cp⁺CpA^{OH} und CpGp⁺ isoliert. Das 3'- Ende der tRNA₃^{Lys} mußte somit die Sequenz



2.4.4. Spaltung von tRNA₃^{Lys} am m⁷G, Isolierung und Sequenzanalyse des kurzen Fragments (43-45, Abb. 17 D).

2 A₂₆₀- Einheiten tRNA₃^{Lys} wurden mit Schlangengiftphosphodiesterase so inkubiert, daß lediglich das 3'- terminale pA abgespalten wurde. Mit hochmarkiertem [^3H] - ATP und mit tRNA- Nukleotidyltransferase wurde die tRNA wieder repariert und somit am 3'- Ende radioaktiv markiert.

0,1 A₂₆₀- Einheiten tRNA₃^{Lys} wurden mit alkalischer Phosphatase am 5'- Ende dephosphoryliert. Nach Inaktivierung der Phosphatase wurde die tRNA an der gleichen Stelle mit

[^{32}P] - ATP und Polynukleotidkinase wieder phosphoryliert.

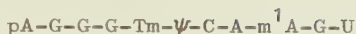
200 A_{260} - Einheiten $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ wurden mit der am 5'- Ende [^{32}P] - markierten und am 3'- Ende [^3H] - markierten $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ vermischt. Danach wurde die tRNA am $m^7\text{G}$ gespalten (44) und an einer DEAE- Säule (200 x 0,7cm) chromatographiert (mit einem linearen Gradienten von 0,1 M bis 0,5 M NaCl mit je 1,0 l Lösung in 7 M Harnstoff pH 3,0). Damit wurden 16 A_{260} - Einheiten des 3'- Endes der $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$, erkennbar an der [^3H] - Markierung, erhalten.

Je 0,1 A_{260} - Einheiten des 3'- terminalen Fragments wurden mit Ribonuklease T_1 und mit pankreatischer Ribonuklease gespalten. Nach 5'- [^{32}P] - Markierung der Spaltprodukte wurde je ein zweidimensionaler "Fingerprint" angefertigt. Die Sequenzierung der markierten Oligonukleotide durch Abbau mit Schlangengiftphosphodiesterase ergab folgende Oligonukleotide:

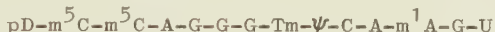
RNase T_1 (27)	pankr.RNase
pD-m ⁵ C-m ⁵ C-A-G	pA-G-G-G-Tm- Ψ
pTm- Ψ -C-A-m ¹ A-G	pA-m ¹ A-G-U
pU-C-C-C-U-G	pG-U
pU-U-C-G	pG-G-G-C
pG-C	pG-C
pC-C-A	

Die seltenen Nukleoside $m^1\text{A}$ und Tm wurden in der $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ nur einmal gefunden. Mit Hilfe obiger Spaltstücke, die diese seltenen Nukleotide enthielten, konnte nur folgende

Sequenz erhalten werden:

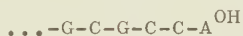


Diese Sequenz verlangte für die Fortführung am 5'- Ende ein T₁- Fragment, das auf....-A-G endigt. Dafür kam nur eines in Frage: pD-m⁵C-m⁵C-A-G. Die Sequenz konnte daher erweitert werden zu:

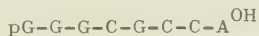


Das 5'- Ende dieses Oligonukleotids mußte mit dem 5'- Ende des Fragments aus der "m⁷G- Spaltung" übereinstimmen, da sonst ein pankreatisches Spaltprodukt mit Dihydrouridin erwartet worden wäre.

Das 3'-Ende des "m⁷G- Fragments" ist pC-C-A^{OH}. Wie im vorigen Abschnitt schon gezeigt wurde, muß die Sequenz fortgesetzt werden mit:

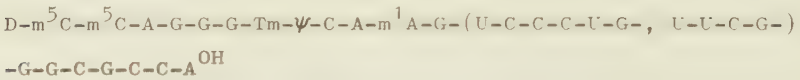


In diesem Hexanukleotid ist das pankreatische Fragment pG-C enthalten. Da es in dem "m⁷G- Fragment" nur einmal vorkommt (durch Messung der Cerenkow- Strahlung aller markierten Spaltprodukte gezeigt), konnte am 5'- Ende des Hexanukleotids nur pG-G-G-C anschließen.



Damit blieben noch pU-U-C-G, pU-C-C-C-U-G und pG-U übrig. Das pankreatische Fragment pG-U ergab sich unabhängig davon, in welcher Reihenfolge die beiden Oligonukleotide verknüpft wurden. Auch beim Einfügen zwischen die bereits abgeleiteten Sequenzen vom 3'- und vom 5'- Ende des "m⁷G-

Fragments" blieben beide Möglichkeiten offen. Die folgende Sequenz war daher noch vorläufig:



2.4.5. Ableitung der Sequenz des Partialfragments IVD
(Abb.11,14)

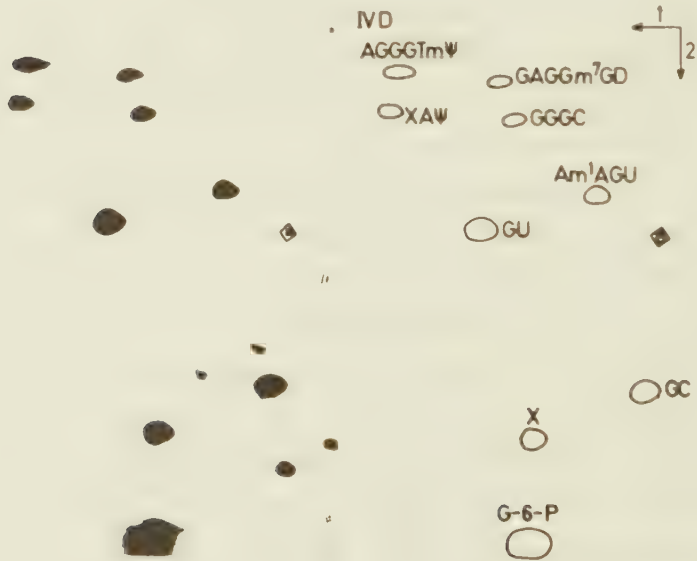


Abbildung 14: Autoradiographie einer zweidimensionalen Hochspannungselektrophorese ("Fingerprint") des Fragments IVD nach Spaltung mit pankreatischer Ribonuklease, Abspalten der 3'- Phosphate mit alkalischer Phosphatase und 5'- [^{32}P] - Markierung der Oligonukleotide.

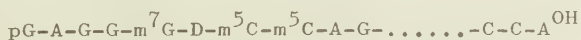
1= Erste Dimension auf Zelluloseacetatfolie in 5% Eisessig/Pyridin pH 3,5 in 7 M Harnstoff.

2= Zweite Dimension auf DEAE- Papier in 7% Ameisensäure (1mM EDTA), X= Artefakt.

Nach Spaltung des Fragments mit Ribonuklease T₁ und mit pankreatischer Ribonuklease wurden folgende Oligonukleotide identifiziert:

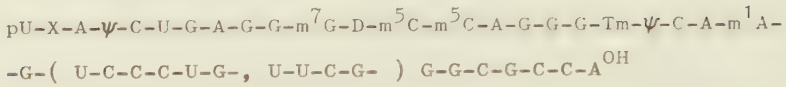
RNase T ₁ (27)	pankr. RNase
pU-X-A- ψ -C-U-G	pX-A- ψ
pA-G	pG-A-G-G-m ⁷ G-D
pm ⁷ G-D-m ⁵ C-m ⁵ C-A-G	pA-G-G-G-Tm- ψ
pTm- ψ -C-A-m ¹ A-G	pA-m ¹ A-G-U
pU-C-C-C-U-G	pG-U
pU-U-C-G	pG-G-G-C
pC-G	pG-C
pC-C-A	

Der Zusammenhang mit dem "m⁷G- Fragment" (Abb. 17 D) ergab sich durch das Oligonukleotid pm⁷G-D-m⁵C-m⁵C-A-G ; da das Fragment IVD außerdem das 3'- terminale -C-C-A^{OH} enthielt, mußte es das ganze " m⁷G- Fragment" enthalten. Am 5'-Ende mußte das pankreatische Fragment mit m⁷G die Sequenz fortführen:



Das Ribonuklease T₁- Spaltprodukt pA-G war in dieser Sequenz schon enthalten. Daher blieb, abgesehen von den schon für die Sequenz des "m⁷G- Fragments" verwendeten Oligonukleotiden, nur noch pU-X-A-~~ψ~~-C-G als Anschluß an

das 5'- Ende der obigen Sequenz übrig:



2.4.6. Partieller Abbau der -C-C-A^{OH}- Hälfte der tRNA^{Lys}₃
 mit Schlangengiftphosphodiesterase.

Bei dem Fragment IVD handelte es sich somit um die 3'-
 Hälfte der tRNA^{Lys}₃. Die Lokalisation zweier Oligonukleo-
 tide war jedoch noch ungeklärt(in Klammern, s. oben).

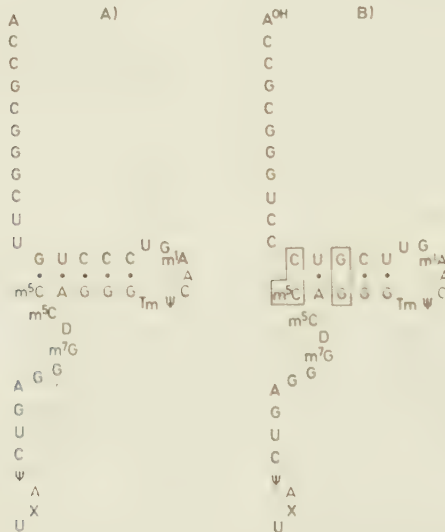


Abbildung 15: Das Fragment IVD in der Form einer Kleeblatt-
 Hälfte mit den beiden möglichen Anordnungen
 der Oligonukleotide U-C-C-C-U-G und U-U-C-G.

Schrieb man die Sequenz in der Form einer Kleeblattthälfte (Abb.15), so blieben die ersten elf Nukleotide vom 3'-Ende des Fragments ungepaart. Schlangengiftphosphodiesterase sollte das Fragment vom 3'-Ende her bis zu den basengepaarten Bereichen abbauen; eine Weiterspaltung sollte erschwert sein.

In einem analytischen Versuch wurden 0,30 A₂₆₀-Einheiten des Fragments IVD in Gegenwart von Mg⁺⁺ mit Schlangengiftphosphodiesterase inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Produkte auf einem 11%igen Polyacrylamidgel getrennt (Abb.16).

Der analytische Versuch zeigte, daß ein bestimmtes Abbauprodukt des Fragments IVD bevorzugt entstand. Es wurde daher versucht, dieses Fragment zu isolieren, um damit die Reihenfolge der beiden noch nicht eindeutig lokalisierten zwei Oligonukleotide im Fragment IV D zu klären.

2 A₂₆₀-Einheiten des Fragments IV D wurden in 600 µl mit 0,1 M Tris·HCl pH 9,0 und 0,01 M MgCl₂ mit 5,5 µg Schlangengiftphosphodiesterase 3 h lang inkubiert. Nach Reinigung auf einem 11%igen Polyacrylamidgel wurde das Hauptprodukt des Abbaus mit Ribonuklease T₁ gespalten. Die 3'-Phosphate der Oligonukleotide wurden mit alkalischer Phosphatase abgespalten, anschließend wurden die Fragmente mit [³²P]-Phosphat am 5'-Ende markiert und mittels zweidimensionaler Hochspannungselektrophorese aufgetrennt.

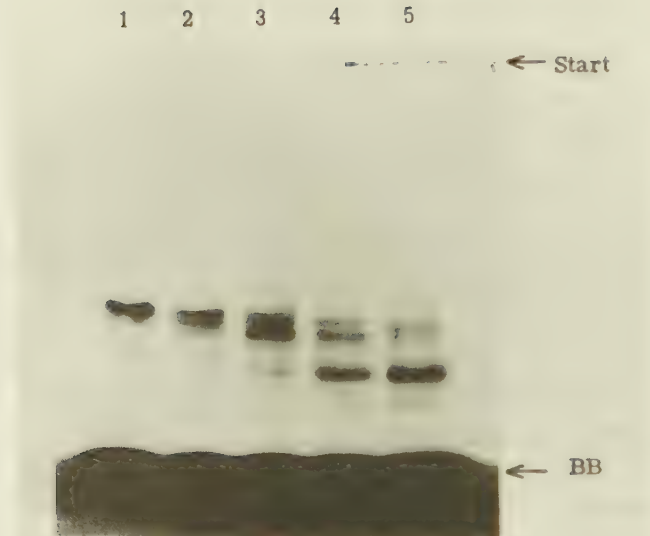


Abbildung 16: Abbau des Fragments IV D mit Schlangengiftphosphodiesterase.

0,30 A_{260} - Einheiten des Fragments IV D wurden mit Schlangengiftphosphodiesterase in 100 μ l (0,01 M $MgCl_2$, 0,1 M Tris-HCl pH 9,0) inkubiert. Nach 15, 40, 90 und 180 min wurden jeweils 25 μ l entnommen und auf ein 11%iges Polyacrylamidgel aufgetragen.

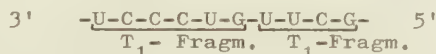
1= Fragment IV D;

2= 15 min Inkubationszeit, 3= 30 min,

4= 90 min, 5= 180 min.

BB= Bromphenolblau

Auf diesem "Fingerprint" fehlten gegenüber dem Fragment IV D die Oligonukleotide pG-C und pG-G-G-C. Das Tetra-nukleotid pU-U-C-G war zwar noch zu erkennen, hatte jedoch gegenüber pU-C-C-C-U-G nur ein Viertel der Radioaktivität. Damit war die Sequenz



gesichert. Diese obige Sequenz läßt sich in der bekannten Kleeblattform anordnen (Abb.15A). Beim Austausch der beiden T₁- Fragmente wären teilweise ungepaarte Bereiche entstanden (Abb.15B).

2.5. Zusammenstellung der Sequenz von tRNA^{Lys}₃ (Abb.17).

2.5.1. Überlappende pankreatische und Ribonuklease T₁- Fragmente von tRNA^{Lys}₃ (Abb.17A).

pankr.RNase	RNase T ₁ (27)
m ⁵ Cp, Cp, Up	Gp
A-Ψp, G-Cp, G-Up	A-Gp, C-Gp
A-m ² G-Cp, A-G-Dp,	D-C-Gp, D-A-Gp
G-G-Dp	C-C-A ^{OH}
G-G-A-Up, G-G-G-Cp	U-U-C-Gp, C-C-C-Gp
A-G-A-Cp	A-U-A-m ² Gp, C-U-C-A-Gp
A-G-A-G-Cp	C-A-Ψ-C-A-Gp
G-A-G-G-m ⁷ G-Dp	Tm- C-A-m ¹ A-Gp
A-G-G-G-Tm-Ψ-p	m ⁷ G-D-m ⁵ C-m ⁵ C-A-Gp
S-Up, A-m ¹ A-G-Up	U-C-C-C-U-Gp
X-A-Ψp	A-C-U-S-U-U-X-A-Ψ-C-U-Gp

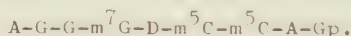
Tabelle 2: Die pankreatischen und Ribonuklease T₁- Fragmente von tRNA^{Lys}₃.

Das Nukleosid m^2G kommt nur einmal in $tRNA_{3}^{Lys}$ vor, die beiden Oligonukleotide $A-m^2G-Cp$ und $A-U-A-m^2Gp$ müssen daher die Sequenz $A-U-A-m^2G-Cp$ bilden. Bei den pankreatischen Fragmenten endet nur eines auf $...-A-Up: G-G-A-Up$. Daraus folgt die Sequenz $G-G-A-U-A-m^2G-Cp$.

Da bei den pankreatischen Fragmenten nur eines auf $...-A-Cp$ endet ($A-G-A-Cp$) und bei den Ribonuklease T_1 -Fragmenten nur eines mit $A-C-..$ beginnt, ist dies eine weitere Überlappungsstelle:



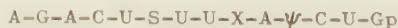
Das Nukleosid m^7G verbindet die Sequenzen $A-G-G-m^7G-D$ und $m^7G-D-m^5C-m^5C-A-Gp$ zu



Eine Überlappungsstelle bilden auch die Nukleoside m^1A und $Tm: A-G-G-G-Tm-\psi-C-A-m^1A-G-Up$.

2.5.2. Verknüpfung der Partialfragmente IE, IIIB und IV D

Durch das aus pankreatischen und Ribonuklease T_1 -Fragmenten abgeleitete Sequenzstück



wurden die Partialfragmente IIIB und IV D verknüpft.

Die Fragmente IE und IIIB wurden durch das einzige, noch nicht in den Partialfragmenten eingebaute pankreatische Fragment ApGpD verbunden.

Die somit in linearer Form abgeleitete Sequenz der $tRNA_{3}^{Lys}$

A	G-G-A-U-A-m ² G-Cp									
	A-G-A-C-U-U-U-U-X-A-W-C-U-Gp									
B	A-G-Dp									
	A-G-G-m ⁷ G-D-m ⁵ C-m ⁵ C-A-Gp									
C	A-G-G-G-Tm- Ψ -C-A-m ¹ A-G-Up									
	U-X-A-W-C-U-G-A-G-G-m ⁷ G-D-m ⁵ C-m ⁵ C-A-G-G-G-Tm- Ψ -C-A-m ¹ A-G-U-C-C-U-G-U-U-C-G-G-G-C-G-C-C-A ^{OH}									
D	D-C-G-G-D-A-G-A-G-C-A-W-C-A-G-A-C-U-S-U-Up									
	U-X-A-W-C-U-G-A-G-G-m ⁷ G-D-m ⁵ C-m ⁵ C-A-G-G-G-Tm- Ψ -C-A-m ¹ A-G-U-C-C-U-G-Up									
E	D-m ⁵ C-m ⁵ C-A-G-G-G-Tm- Ψ -C-A-m ¹ A-G-U-C-C-U-G-U-U-C-G-G-G-C-G-C-C-A ^{OH}									
	C-G-C-C-A ^{OH}									
F	pG-C-C-C-G-A-U-A-m ² G-C-U-C-A-G-D-C-G-D-A-G-A-G-C-A-W-C-A-G-A-C-U-U-U-U-X-A-W-C-U-G-A-G-G-m ⁷ G-D-m ⁵ C-m ⁵ C-A-G-G-G-Tm- Ψ -C-A-m ¹ A-G-U-C-C-U-G-U-U-C-G-G-G-C-G-C-C-A ^{OH}									
	C-G-C-C-A ^{OH}									

Abbildung 17:

Ableitung der Sequenz von tRNA₃^{Lys}

- A Überlappende pankreatische und Ribonuklease T₁- Fragmente.
 B Fragmente der partiellen Alkalihydrolyse in Gegenwart von Mg⁺⁺.
 C Part., Abbau des Fragments IV D mit Schlängengiftphosphodiesterase.
 D Fragment nach Spaltung von tRNA^{Lys} am m⁷G.
 E Abbau des 3'-terminalen -CpCpA^{OH}- Endes mit Schlängengiftphosphodiesterase und Reparatur mit α -[³²P]-CTP und ATP mittels Nukleotidyltransferase.
 F Sequenz der tRNA₃^{Lys}.

konnte in der zweidimensionalen Form eines Kleeblatts geschrieben werden (Abb.18).

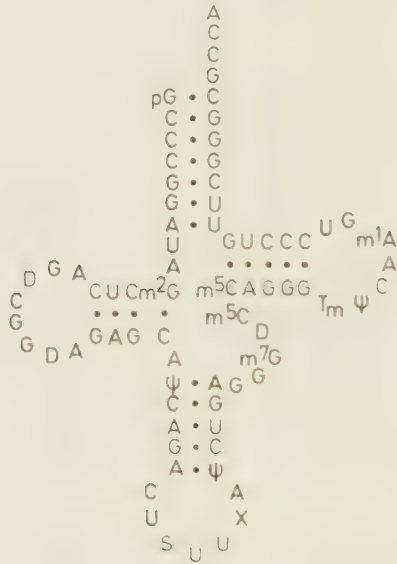


Abbildung 18: tRNA ^{lys}₃ aus Kaninchenleber in der Kleeblattstruktur.

2.6. Das schwefelhaltige Nukleosid S im Anticodon und das fluoreszierende Nukleosid X neben dem 3'-Ende des Anticodons.

2.6.1. Identifizierung von 2-Thio-5-carboxymethyluridinmethylester in tRNA₃^{Lys} aus Kaninchen- und Rattenleber.

Das schwefelhaltige Nukleosid S in Kaninchenleber-tRNA₃^{Lys} wurde aus dem pankreatischen Fragment SpUp isoliert. Ribonuklease T₁ und Ribonuklease T₂ konnten das Dinukleotid nicht spalten.

In der Nukleotidanalyse von tRNA₃^{Lys} (Abb.19) wurde das Dinukleotid nicht gefunden. Möglicherweise wurde es während der Chromatographie in der zweiten Dimension abgebaut. Ein Kontrollversuch mit 5'-[³²P]-markiertem pSpU im gleichen Laufmittel ergab, daß es zu mehreren Produkten abgebaut wurde. In den Laufmitteln A, C und D war keine Zersetzung zu beobachten.

Erst nach Abspalten des 3'-Phosphats und durch Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase konnte aus dem Dinukleotid SpU das Nukleosid S erhalten werden.

Die UV-Spektren des Nukleosids S waren bei pH 1, 7 und 13 sehr ähnlich denen von authentischem 2-Thio-5-carboxymethyluridinmethylester (Abb.20). Da sich diese UV-Spektren jedoch nur wenig von anderen 2-Thiouridinderivaten unter-



Abbildung 19: 5 A₂₆₀- Einheiten tRNA^{Lys}₃ wurden mit Ribonuklease T₂ gespalten; die Auftrennung der 3'- Nukleotide erfolgte durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie (46) in Laufmittel A (1.Dimension) und Laufmittel B (2.Dimension); *Up= Tmψp.

scheiden, wurde die Identität des Nukleosids S mit 2-Thio-5-carboxymethyluridinmethylester durch Cochromatographie auf Dünnschichtplatten gezeigt (Tabelle 3).

Um eine weitergehende Charakterisierung auf dem Nukleotid-niveau durchführen zu können, wurden die authentischen Nukleoside mem⁵s²U und m⁵s²U in 5'- Position phosphoryliert. Phosphatdonor war Phenylphosphat, katalysiert wurde die Reaktion durch Nukleosidphosphorylase aus Karotten (47).

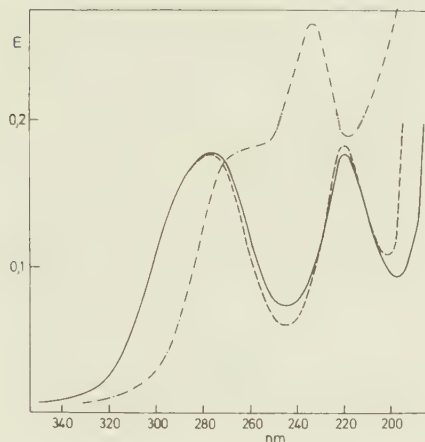


Abbildung 20: UV-Spektren des Nukleosids S in tRNA^{Lys}₃ bei pH 1 ----, pH 7 — und pH 13 -.-.-,

Laufmittel	C (R _{Gp})	D (R _{Gp})	E (R _{Gp})
Nukleosid S	2,44	1,97	2,07
mcm ⁵ s ² U	2,44	1,97	2,07
mnm ⁵ s ² U	2,33	1,81	0,95
m ⁵ s ² U	2,20	1,84	1,81

Tabelle 3: R_{Gp}- Werte des Nukleosids S aus tRNA^{Lys}₃, von 2-Thio-5-carboxymethyluridinmethylester, 2-Thio-5-(N-methylaminomethyl)uridin und 2-Thio-5-methyluridin in den Laufmitteln C,D und E (siehe 4.2.6.).

Die Enzympräparation wurde in diesem Labor von Dr.M.Burg-hagen durchgeführt. Ein Aliquot der 5'- phosphorylierten 2-Thiouridinderivate wurde wieder dephosphoryliert

mit alkalischer Phosphatase und in den Laufmitteln C,D und E wurde die Identität mit dem Ausgangsmaterial gezeigt.

Dünnschichtchromatographische Untersuchungen wurden nun mit 5'-[^{32}P] - markiertem pS aus tRNA₃^{Lys} durchgeführt. Nach Spaltung von tRNA₃^{Lys} mit pankreatischer Ribonuklease, Abspalten von 3'- Phosphat mit alkalischer Phosphatase und Markieren der Fragmente mit 5'-[^{32}P] - Phosphat wurde nach zweidimensionaler Hochspannungselektrophorese $^{32}\text{pSpU}$ isoliert. Mit Schlangengiftphosphodiesterase wurde pU abgespalten (Abb. 21,22, Tabelle 4).

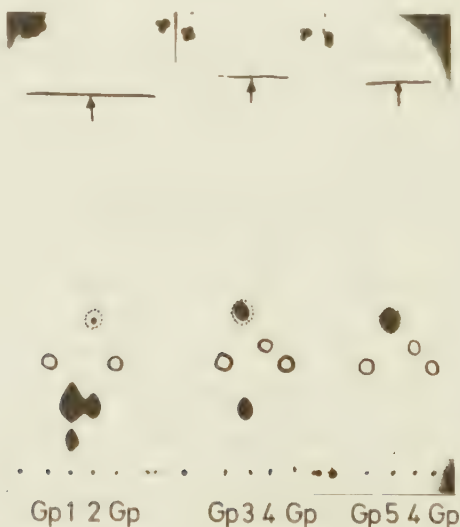


Abbildung 21: Autoradiographien von Dünnschichtchromatographien auf Zelluloseplatten. Die phosphorylierten 2-Thioderivate wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht und auf den Röntgenfilmen

angezeichnet (punktierte Kreise). Laufmittel A; die Pfeile deuten auf die Lösungsmittelfront.

1= $^{32}\text{pSpU}$

2,3,5= $^{32}\text{pSpU}$ + Schlangengiftphosphodiesterase (Inkubationszeiten 60,120,240 min); nach 240 min Inkubation war vollständig zu ^{32}pS durchgespalten.

Cochromatographie mit $\text{pmcm}^5\text{s}^2\text{U}$.

4= $\text{pm}^5\text{s}^2\text{U}$

$\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ = 2-Thio-5-methyluridin

$\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$ = 2-Thio-5-carboxymethyluridinmethylester.

Laufmittel	A R_{Gp}	C R_{Gp}	D R_{Gp}	F R_{Gp}	G R_{Gp}	H R_{Gp}
^{32}pS	1,49	1,84	1,28	1,28	1,24	2,70
$\text{pmcm}^5\text{s}^2\text{U}$	1,49	1,84	1,28	1,28	1,24	2,70
$\text{pm}^5\text{s}^2\text{U}$	1,16	1,49	1,14	1,03	0,87	1,33

Tabelle 4: R_{Gp} - Werte der authentischen Nukleotide $\text{pmcm}^5\text{s}^2\text{U}$ und $\text{pm}^5\text{s}^2\text{U}$ und des 5'-[^{32}P]-markierten schwefelhaltigen Nukleotids pS aus Kaninchenleber tRNA₃^{Lys} in verschiedenen Laufmitteln (siehe 4.2.6).

In unserem Labor isolierte Dr.D.Wildenauer tRNA₃^{Lys} aus Rattenleber. Mit Hilfe von pankreatischen und Ribonuklease T₁- "Fingerprints" wurde gezeigt, daß diese tRNA identisch mit tRNA₃^{Lys} aus Kaninchenleber ist. Aus dem

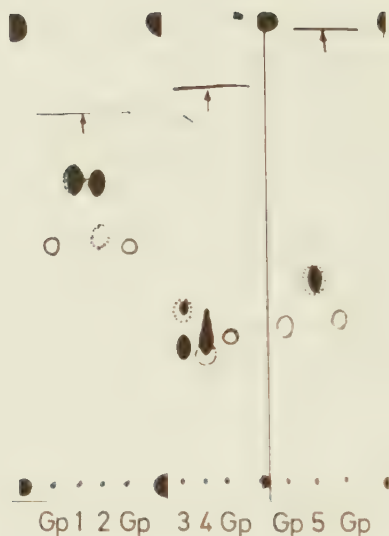


Abbildung 22: Autoradiographien von Dünnschichtchromatographien auf Zelluloseplatten. Die phosphorylierten 2-Thioderivate wurden unter UV- Licht sichtbar gemacht und auf den Röntgenfilmen angezeichnet (punktierte Kreise). Die Pfeile deuten auf die Lösungsmittelfront.

- 1= ^{32}pS + $\text{pmcm}^5\text{s}^2\text{U}$ in Laufmittel F
 - 2= ^{32}pS + $\text{pm}^5\text{s}^2\text{U}$ in Laufmittel F
 - 3= ^{32}pS + $^{32}\text{pSpU}$ + $\text{pmcm}^5\text{s}^2\text{U}$ in Laufmittel G
 - 4= ^{32}pS + $^{32}\text{pSpU}$ + $\text{pm}^5\text{s}^2\text{U}$ in Laufmittel G
 - 5= ^{32}pS + $\text{pmcm}^5\text{s}^2\text{U}$ in Laufmittel G
- $\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ = 2-Thio-5-methyluridin
 $\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$ = 2-Thio-5-carboxymethyluridinmethylester.

pankreatischen "Fingerprint" wurde im Rahmen dieser Arbeit $^{32}\text{pSpU}$ isoliert und nach Abspalten des pU mit Schlangengiftphosphodiesterase konnte das Nukleotid pS aus Rattenleber mit dem aus Kaninchenleber verglichen werden: In den Laufmitteln A,D,F,G waren die beiden 2-Thiouridin-derivate identisch mit authentischem $\text{pmcm}^5\text{s}^2\text{U}$.

2.6.2. Charakterisierung des fluoreszierenden Nukleosids X

Neben dem 3'-Ende des Anticodons wurde ein fluoreszierendes Nukleosid gefunden. Dieses Nukleosid X wurde durch UV-Spektren bei pH 1, 7 und 13 (Abb.23) und in den Laufmitteln A,B und C (Tabelle 5) charakterisiert.

Laufmittel	A R_{Gp}	B R_{Gp}	C R_{Gp}
X			1,74
Xp	1,28	2,75	1,40

Tabelle 5: R_{Gp} - Werte des unbekannten Nukleotids Xp in den Laufmitteln A,B,C (siehe 4.2.6).

Massenspektrum des unbekannten Nukleosids X (Abb.24)

Es gab Gründe für die Annahme, daß es sich bei dem unbekannten Nukleosid um ein Guanosinderivat handeln könnte. Nukleoside und besonders Guanosin sind schwer flüchtig. Um die Flüchtigkeit zu erhöhen, silylierten wir das Nukleosid mit Bis (trimethylsilyl-) acetamid (BSA) in Acetonitril.

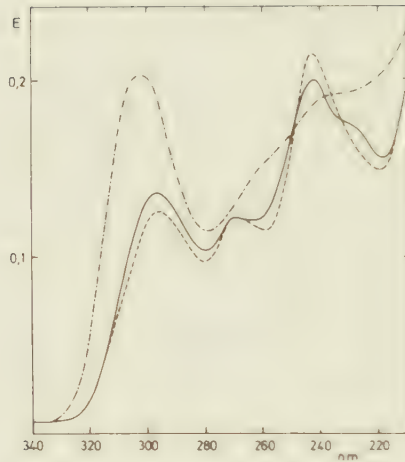


Abbildung 23: UV- Spektren des unbekannten, fluoreszierenden Nukleosids X in tRNA ^{Lys}₃ bei pH 1 ----, pH 7 — und pH 13 .-.-.-.

Im Massenspektrum eines silylierten Nukleosids beobachtet man drei Arten von Ionen:

- 1) Das Molekülion,
 - 2) Ionen, die nur aus der Ribose stammen,
 - 3) Ionen mit intakter Base und Ribosefragmenten.
- Silyl-Ionen, wie m/e 73, 147 haben keine Bedeutung für die Struktur des Moleküls.

Zu 2) Typisch für das Molekülion ist ein Signal bei M-15, hervorgerufen durch die Abspaltung eines Methylradikals einer TMS- Gruppe. Die Paare m/e 601,586, m/e 529,514, m/e 457,442, m/e 385,370 sind jeweils

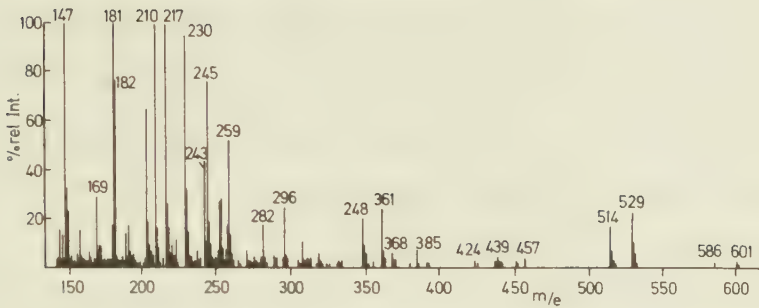


Abbildung 24: Massenspektrum des unbekannten Nukleosids X in tRNA^{Lys}₃ neben dem 3'-Ende des Anticodons. Das Nukleosid wurde silyliert.

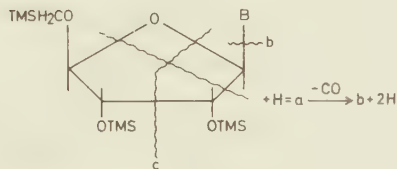


Abbildung 25: Typische Fragmentierungen an der Ribose eines Nukleosids (48)
B= Base; TMS= Trimethylsilyl-

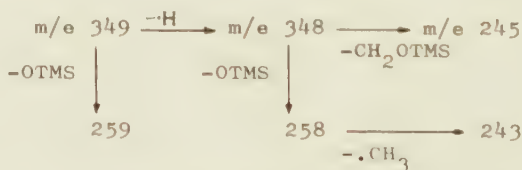
durch eine Differenz von 72 Masseneinheiten bestimmt. Das zeigt, daß das Nukleosid unterschiedlich viel Trimethylsilylgruppen am Molekül trug.

Zieht man vom möglichen Molekülion m/e 601 eine vollständig silylierte Ribose ab, so ergibt sich $b+1=181$. Die Masse der unbekannten Base könnte nach dieser Rechnung jedoch um $n \times 72$ größer sein, da Molekülionen m/e 601 + $n \times 72$ wegen geringer Intensität möglicherweise nicht beobachtet werden konnten.

Eine Masse $M-90$ zeigt eine Eliminierung von Trimethylsilanol. Zu sehen sind m/e 529 $\rightarrow$ 439, m/e 514 $\rightarrow$ 424, m/e 439 $\rightarrow$ 349.

Das Verhältnis $M/M-15$ ist größer als 1. Das ist bei Guaninderivaten der Fall.

Zu 2) Der gesamte Ribosylrest (Ribose minus H) mit drei Trimethylsilyl-(TMS-)Gruppen erscheint bei m/e 349 und fragmentiert nach folgendem Schema (48):



Weitere Ribosefragmente sind $C_3H_3(OTMS)_2$ m/e 217 und $C_4H_4(OTMS)_2$ m/e 230. Die Fragmente schließen eine Methylierung der Ribose aus.

Zu 3) Wenn man davon ausgeht, daß m/e 181 die Masse der Base ist (d.h. $b+1$), sollte man typische Signale wie $a = b+2H$ ($m/e = 182$), $b + CHO + H = b + 30$ (m/e 210) und

$c = b + 115$ (m/e 296) sehen. Sie sind im Spektrum zu erkennen. Eine Neuzusammensetzung von H und TMS an der Base nach Bruch der glykosidischen Bindung ergibt $b + 74$ (m/e 254). Die genannten typischen Signale treten erneut mit einer Basenmasse m/e $181 + 72 = 253$ auf. Das bedeutet, daß hier noch eine Silylgruppe an der Base geblieben ist, während die Ribose zerfällt.

$b^+ + H$ m/e 253, $b^+ + 2H$ m/e 254, $b^+ + 30$ m/e 282, c^+ m/e 368.

Ein prominentes, nicht interpretiertes Signal bei m/e 361 fiel uns auf, weil es $2b + 1$ entspricht.

Massenspektrum der Base X (Abb.26)

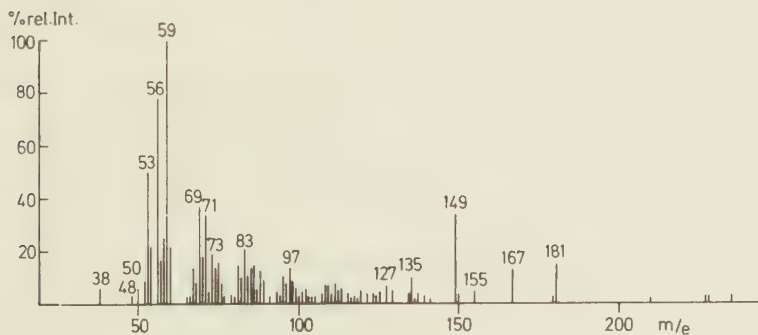


Abbildung 26: Massenspektrum der Base X.

Das von uns erwartete Signal bei m/e 181 trat auf. Eine vernünftige Interpretation weiterer Signale war uns nicht möglich.

3. Diskussion der Ergebnisse

Die Nukleotidsequenz einer lysinspezifischen tRNA aus Kaninchenleber wurde aufgeklärt. Sequenziert wurde die tRNA sowohl mittels "klassischer" Methoden nach Holley (25) als auch durch "in vitro" 5'-[^{32}P] - Markierung der Oligonukleotide mit Polynukleotidkinase nach Sanger (26).

Das Arbeiten mit ^{32}P erforderte erheblich weniger Zeit und Material als "klassische" Techniken und ist daher die geeignete Methode zur Sequenzierung von Säuger- tRNAs : Der Zeitaufwand reduziert sich schätzungsweise auf ein Viertel, der Materialbedarf auf ein Hundertstel.

Die seltenen Nukleotide waren jedoch mit "klassischen" Methoden leichter zu identifizieren. Nur wenn sich das seltene Nukleotid am 5'- Ende eines Fragments befand, war nach 5'- [^{32}P] - Markierung eine sichere Identifizierung möglich. Nach Abbau des Fragments mit Schlangengiftphosphodiesterase konnte das 5'- [^{32}P] - markierte Nukleotid durch Cochromatographie mit authentischem Material identifiziert werden. So konnte ^{32}pS in tRNA Lys_3 aus Ratten- und Kaninchenleber aus dem pankreatischen Fragment $^{32}\text{pSpU}$ isoliert werden. Mit authentischen, 5'- phosphorylierten 2-Thiouridinderivaten wurde ^{32}pS als 2-Thio-5-carboxymethyluridylsäuremethylester identifiziert.

Die Sequenz der tRNA Lys_3 ließ sich in der bekannten Form eines Kleeblatts anordnen.

Die Schleife 4 der tRNAs (Abb.1), die Ribosomenbindungsschleife, hat sich im Laufe der Evolution als besonders stabil erwiesen. Fast alle tRNAs enthalten dort das modifizierte Nukleosid 5- Methyluridin, welches gewöhnlich als Ribothymidin (T) bezeichnet wird, in der Sequenz G-T- Ψ -C-G(A) (49). Es fehlt nur in wenigen Fällen, dabei ist Ribthymidin entweder durch Uridin (50-55), oder im Falle der eukaryotischen zytoplasmatischen Initiator-tRNAs durch Adenosin ersetzt (44,56-59). In der tRNA eines sehr hitzestabilen Bakteriums wurde statt Ribothymidin 2-Thio-5-methyluridin (m^5s^2U) gefunden (60). Bei der DNA-Synthese des Rous- Sarkoma- Virus wirkt eine tryptophanspezifische tRNA als Starter. Bei dieser tRNA ist die Sequenz G-T- Ψ -C-G durch G- Ψ - Ψ -C-G ausgetauscht (10).

Obwohl nahezu alle bisher sequenzierten tRNAs Ribothymidin (T) enthalten, haben Analysen des T- Gehaltes von unfraktionierter tRNA aus verschiedenen Säugergeweben teilweise sehr viel weniger als 1 Mol Ribothymidin pro Mol tRNA ergeben(61-65). Die dazu verwendeten analytischen Methoden waren: Abbau der tRNAs mit Ribonuklease T_2 , mit Alkali und mit einer Mischung von Schlangengiftphosphodiesterase und alkalischer Phosphatase. In den lysinspezifischen tRNAs aus Kaninchenleber wurde in allen bisher sequenzierten Spezies (27,66) nur 2'-O-Methylribothymidin anstelle von T gefunden. Das Dinukleotidphosphat Tmp Ψ ist weitgehend resistent gegen Alkali, Ribonuklease T_2 und

Schlangengiftphosphodiesterase. Die niedrigen Werte für den T- Gehalt in unfraktionierter Säuger- tRNA müssen zum Teil darauf zurückgeführt werden.

Die Schleife 4 wird als Ribosomenbindungsort der tRNAs angesehen. E. coli 50S- Ribosomen verlieren nach Vorinkubation mit Tp Ψ pCpGp die Fähigkeit, aminoacylierte tRNA zu binden(19-21). Die zu Tp Ψ pCpGp komplementäre Sequenz CpGpApAp konnte auf 5S RNA der großen ribosomalen Unter- einheit in verschiedenen Geweben gefunden werden (67-72). Die Funktion des Ribothymidins ist noch ungeklärt, da von E. coli Mutanten isoliert wurden, deren tRNAs Uridin statt Ribothymidin enthalten, die aber dennoch eine normale Proteinbiosynthese haben (53,73). Die lysinspezifischen tRNAs aus Kaninchenleber waren ebenfalls voll aktiv in der Proteinbiosynthese, sowohl in bakteriellen, als auch in eukaryotischen proteinsynthetisierenden Systemen (74). Ob die 2'-O-Methylierung von Ribothymidin in diesen tRNAs essentiell für die Proteinbiosynthese ist, oder ob dadurch andere spezifische Funktionen für diese tRNAs ermöglicht werden, muß offen bleiben.

Das Anticodon der tRNA^{Lys}₃ wird durch SUU gebildet, wobei S als 2-Thio-5-methylcarboxyuridinmethylester identifiziert wurde. 2-Thioderivate in der ersten Position im Anticodon wurden sowohl bei Bakterien als auch bei Säuger-tRNAs vermutet oder gefunden. Sieht man von einer

mutierten tRNA^{Gly} (75) ab, so hat keine bisher sequenzierte tRNA ein unmodifiziertes Uridin in der ersten Position des Anticodons.

Eine tRNA mit dem Anticodon UUU sollte entsprechend der Wobblehypothese (16) beide Lysin-Codons AAA und AAG erkennen. Die Modifizierung von Uridin zu einem 2-Thiouridinderivat führt jedoch zu einer spezifischen Basenpaarung mit Adenosin in der dritten Position des Codons. In einem "in vitro"- proteinsynthetisierenden E. coli-System mit den synthetischen mRNAs poly A und poly (AAG) hatte die tRNA₃^{Lys} eine deutliche Präferenz für AAA, jedoch auch AAG wurde als Codon erkannt (74).

T.Sekiya et al. (76) konnten bei tRNA₃^{Glu} mit dem Anticodon SUC mit synthetischer mRNA auch nur eine Präferenz von GAA gegenüber GAG feststellen, während bei natürlicher mRNA und niedriger Mg⁺⁺-Konzentration fast ausschließlich GAA als Codon verwendet wurde.

Die Spezifität von 2-Thiouridinderivaten für Adenosin im Codon wurde damit erklärt, daß der Schwefel am C-2 des Thiouridins nur eine sehr schwache Wasserstoffbrückenbindung mit der N-1- Iminogruppe des Guanosins bilden kann. (S...H- Wasserstoffbrückenbindungen sind sehr viel weniger stabil als O...H- Bindungen.)

Über die mögliche Bedeutung der 2-Thiouridinderivate für eine präzise Codonerkennung der tRNAs wurde diskutiert (77,78).

Eine Spaltung von tRNA Lys_3 mit Ribonuklease T_2 liefert S ($\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$) als Bestandteil des Dinukleotids SpUp. Dieses Dinukleotid ist resistent gegen Alkali, Ribonuklease T_2 und pankreatische Ribonuklease. In einer Nukleotidanalyse durch zweidimensionale Dünnschichtchromatographie konnten wir das Dinukleotid SpUp nicht nachweisen. Es gab Hinweise dafür, daß es in dem stark sauren Laufmittel der zweiten Dimension zersetzt wird.

F. Kimura- Harada et al. (79) hatten in tRNA Lys_2 aus Rattenleber 2-Thio-5-methyluridin ($\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$) in der ersten Position des Anticodons gefunden. Dieses 2-Thiouridin-derivat wurde von diesen Autoren nach Spaltung der tRNA mit Ribonuklease T_2 durch zweidimensionale Papierchromatographie als Nukleotid isoliert. Die von uns sequenzierte tRNA Lys_3 ist entsprechend dem Elutionsprofil nach Reinigung über DEAE- Sephadex identisch mit der obigen tRNA Lys_2 (80). Ratten und Kaninchen sind in der Evolution so nahe verwandt, daß kein Unterschied zwischen homologen tRNA-Spezies sein sollte (81,82).

In tRNA Lys_3 aus Kaninchenleber fanden wir als einziges schwefelhaltiges Nukleosid nur 2-Thio-5-carboxymethyluridinmethylester ($\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$) an der ersten Position im Anticodon. Die Identität wurde sowohl als Nukleosid als auch als Nukleotid mit authentischen Markern bewiesen. Die von F. Kimura- Harada et al. beschriebene tRNA Lys_2 wurde daraufhin in unserem Labor aus Rattenleber isoliert.

Mit Hilfe von "Fingerprints" wurde gezeigt, daß tRNA Lys_3 aus Kaninchenleber völlig identisch ist mit tRNA Lys_2 aus Rattenleber. Aus beiden tRNAs wurde als einziges 2-Thio-uridinderivat im Anticodon $\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$ isoliert. In keinem Fall wurde $\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ gefunden. Der Nachweis von $\text{m}^5\text{s}^2\text{U}$ im Anticodon von tRNA Lys_2 aus Rattenleber durch F. Kimura-Harada et al. (79) kann somit nur durch einen Irrtum oder durch eine Materialverwechslung verursacht worden sein.

Das Purinnukleosid neben dem 3'-Ende des Anticodons ist in fast allen tRNAs hypermodifiziert (83). Dies scheint für die Proteinbiosynthese notwendig zu sein. Chemische Modifikation dieser hypermodifizierten Nukleoside, z.B. die Jodierung der Isopentenylgruppe von Isopentenyladenosin in tRNA Ser aus Hefe (84), oder Abspalten der "Y"-Base in tRNA Phe durch Säurebehandlung (85) vermindert die Bindung der tRNA an das Ribosom und damit auch die Fähigkeit, an der Proteinbiosynthese teilzunehmen.

tRNA Lys_3 enthält neben dem 3'-Ende des Anticodons ein bisher noch nicht beschriebenes, unter UV-Licht im Neutralen und Basischen hellblau fluoreszierendes Nukleosid X. Die Interpretation der Massenspektren des silylierten Nukleosids führte zwar zu einem Molekulargewicht der Base von $M = 181$, jedoch waren die Fragmentierungen der Base nicht zu interpretieren.

In vielen tRNAs ist N-9-(β -D-Ribofuranosyl) purin-6-yl-

carbamoyl -L-threonin (t^6A) das hypermodifizierte Nukleosid, wenn in der ersten Position des Codons ein Adenosin steht (86). Das UV- Spektrum des Nukleosids X zeigte keine Ähnlichkeit mit dem von t^6A (87), ein Nebenprodukt nach Abspalten der Ribose hatte jedoch ein mit t^6A identisches UV- Spektrum. Daher ist es durchaus möglich, daß das unbekannte Nukleosid ein Derivat von t^6A ist. Protonenresonanzspektren waren wegen der geringen zur Verfügung stehenden Stoffmenge nicht möglich.

4. Experimenteller Teil

4.1. Material

4.1.1. Enzyme

RNase T₁ (E.C. 3.1.4.8) und RNase T₂ (E.C. 3.1.4.23) aus *Aspergillus oryzae* wurden von der Fa. Sankyo Co. Ltd., Tokyo, gekauft, Schlangengiftphosphodiesterase (E.C. 3.1.4.1) war von Worthington Biochemical Corporation. Von Boehringer Mannheim stammten Ribonuklease A aus Rinderpankreas (E.C. 3.1.4.22), alkalische Phosphatase aus *E. coli* (E.C. 3.1.3.1), Polynukleotidphosphorylase aus *Mikrococcus lysodeicticus* (E.C. 2.7.7.8), Hexokinase aus Hefe (E.C. 2.7.1.1), Phosphoglycerat-Kinase aus Hefe (E.C. 2.7.2.3) und Kaninchenmuskel- Glycerinaldehyd- 3- phosphatdehydrogenase (E.C. 1.2.1.12). Polynukleotid-Kinase aus T₄-Phageninfizierten *E. coli*- Zellen wurde in unserem Labor von Dr.D.Wildenauer isoliert und gereinigt (36,37). Nukleosid-transferase aus Karotten wurde in unserem Labor von Dr.M.Burghagen isoliert (47).

4.1.2. Material für Säulenchromatographien

DEAE- Sephadex A-50 stammte von Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden, DEAE- Zellulose DE 23 von Whatman Biochemicals Ltd., benzoyleierte DEAE- Zellulose von Boehringer Mannheim. RPC 5- Säulenmaterial wurde von M.Raba in diesem Labor aus Trifluorchlorpolyäthylen von Serva und "Adogen 464"

(Tricetylmethylammoniumchlorid) von Interchem, München, hergestellt.

4.1.3. Material für Dünnschichtchromatographien

Zellulose- Fertigplatten für die Dünnschichtchromatographie (ohne Fluoreszenzindikator) wurden bei der Fa.Merck, Darmstadt, gekauft.

4.1.4. Nukleoside und Nukleotide

N^2 - Monomethylguanosin und N^2 - Dimethylguanosin waren ein Geschenk von Dr.M. Saneyoshi, Tokyo. 5- Methylcytidin, 1- Methyladenosin und 6- Methyladenosin wurden von Cyclo Chemicals, Los Angeles, gekauft. Freundlicherweise wurden für uns synthetisiert 2-Thio-5-carboxymethyluridinmethylester und 2-Thio-5- (N- methylaminomethyl-)uridin von Dr.H. Vorbrüggen, Schering AG, Berlin und 2-Thio-5-methyluridin von Dr.K.H. Scheit, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen. Die Identität dieser 2-Thiouridinderivate wurde von uns durch Massenspektren nochmals überprüft. Von 2-Thio-5- carboxymethyluridinmethylester und 2-Thio-5- methyluridin wurden auf enzymatischem Wege (mit Nukleosidtransferase aus Karotten und Phenylphosphat als Phosphatdonor) die 5'- Nukleotide hergestellt. Alle anderen Nukleotide und Nukleoside wurden von Boehringer Mannheim gekauft.

4.1.5. Hochspannungselektrophorese

Für die Hochspannungselektrophorese wurden in der ersten Dimension Zelluloseacetatfolien (30 x 550mm) der Fa. Schleicher und Schüll GmbH, Dassel, verwendet. Die zweite Dimension lief auf DEAE- Papier Whatman DE 81 (570 x 460mm).

4.1.6. Radioaktive Substanzen und Filme

Trägerfreie [^{32}P] - Phosphorsäure und [^3H] - markierte Aminosäuren wurden von NEN- Chemicals, Dreieichenheim, erworben. Autoradiographien wurden mit Kodak RP Royal-X-Omat RP/R54 Röntgenfilm ausgeführt.

4.1.7. Geräte

Zentrifugen: Zentrifuge "Stock" mit 8 x 1350 ml- Bechern, Ultrazentrifuge IEC B-60 und IEC B-20 Highspeed, Heraeus Christ Minifuge, Heraeus Christ HC 102 Mikrofuge.

Massenspektrometer: CH 7 der Fa. Varian Mat; Einlaß bis 275°C, Elektronenenergie 70 eV, Emission 300 uAmpère.

UV- Spektrophotometer: Gilford Modell 240, selbstregistrierend, Bausch und Lomb Spectronic 700.

Szintillationsspektrometer: Packard Tricarb Modell 3380 mit AAA und Modell 3390.

Hochspannungselektrophorese: Savant Instr.Inc., Hicksville, New York, Modell 8036.

4.2. Methoden

4.2.1. Isolierung von tRNA aus Kaninchenleber (88)

4.2.1.1. Homogenisieren und Phenolisieren der Kaninchenleber (KL)

10 kg tiefgefrorene KL wurden in Portionen zu etwa 100 g mit je 150 ml Phenollösung, 45 ml 1 M Saccharoselösung, 150 ml 0,1 M Tris·HCl- Puffer pH 7,0 und 150 mg Bentonit versetzt. Alles zusammen wurde in einem Haushaltsmixer (Braun) homogenisiert. Die gesammelten Homogenisate wurden 1 h lang geschüttelt. Durch Zugabe von 2,0 l 0,05 M Tris·HCl- Puffer pH 7,0 wurde die wäßrige Phase verdünnt. Die Lösung wurde 10 min lang zentrifugiert, wobei sich die Phenolphase und feste Teilchen absetzten. Die überstehende wäßrige Phase wurde abgegossen und gesammelt. Der wäßrigen Phase wurden danach sofort 0,1 Vol 2M Natriumacetat pH 5,1, dann zwei Volumina Äthanol zugegeben, gut geschüttelt und die Mischung über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der flockige, weiße Niederschlag von Nukleinsäuren wurde abzentrifugiert und der Reihe nach gewaschen mit Äthanol (mit 1% Natriumacetat pH 5,1), dann mit Äthanol, versetzt mit 0,1% Natriumacetat, dann mit Äther: Äthanol im Verhältnis 1 : 1, ebenfalls versetzt mit 0,1% Natriumacetat pH 5,1. Der etwas bräunliche Rückstand wurde im Vakuumexsikkator getrocknet.

4.2.1.2. Adsorption an DEAE- Zellulose

Das getrocknete Produkt wurde mit dem Mörser verrieben und unter Rühren in 5 l 0,1 M Natriumacetat pH 5,1 gelöst.

Die Lösung wurde zentrifugiert, der Rückstand nochmals mit Pufferlösung extrahiert und erneut zentrifugiert. Der Rückstand wurde dann verworfen.

1,5 kg DEAE- Zellulose (Feuchtgewicht) wurden mehrmals mit 0,1 M Natriumacetat pH 5,1 gewaschen, dann mit dem gelösten Produkt verrührt. Die Zellulose mit den adsorbierten Nukleinsäuren wurde abgesaugt und mit 0,1 M Natriumacetat pH 5,1 so lange gewaschen, bis das Filtrat mit dem zweifachen Volumen Äthanol keine Trübung mehr gab. Weiter wurde die Zellulose mit 0,1 M NaCl, dann mit 0,2 M NaCl und zuletzt mit 0,3 M NaCl im obigen Puffer gewaschen.

tRNA und ribosomale Nukleinsäuren wurden nun von der Zellulose desorbiert. Dazu wurde die Zellulose mehrmals mit 1 M NaCl im obigen Puffer verrührt (etwa 800 ml jedesmal) und über einen Büchnertrichter abgesaugt, bis die optische Dichte des Eluates unter einer A_{260} - Einheit pro ml lag. Die vereinigten Eluate wurden nochmals filtriert. Es ergaben sich 230 000 A_{260} - Einheiten Nukleinsäurematerial. Mit dem zweifachen Volumen Äthanol wurde gefällt und über Nacht im Kühlraum stehen gelassen. Der Niederschlag wurde dann abzentrifugiert, zweimal mit Äthanol/Äther (1:1), dann mit Äther allein, gewaschen.

4.2.1.3. Fraktionierte Fällung mit Isopropanol

Getrocknet wogen die Nukleinsäuren jetzt 8,21 g. Es wurde in 82,1 x 50 ml = 410,5 ml 0,3 M Natriumacetatpuffer pH 5,1 gelöst und mit 0,54 Volumina = 222 ml Isopropanol tropfenweise unter Rühren versetzt. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und verworfen. Es sind DNS- Bruchstücke und ribosomale RNA. Mit weiteren 0,44 Volumina = 180 ml Isopropanol wird jetzt die tRNA gefällt. Sie wird abzentrifugiert und zweimal mit Äther/Äthanol (1 : 1), dann mit Äther allein, gewaschen.

Die getrocknete tRNA, ein weißliches Pulver, wog 4,1 g.

Die Ausbeute betrug somit 410 mg pro kg KL.

4.2.2. Ionenaustauscher für Säulenchromatographien

Vorbereitung der Ionenaustauscher

DEAE- Sephadex A-50 wurde suspendiert in 1 M NaCl und 0,02 M Tris·HCl pH 7,5. Nach fünfstündigem Stehen wurde dekantiert, um Feinteile abzugießen, dann wurde abgesaugt. Das Sephadex wurde jetzt in H₂O suspendiert und über Nacht im Kühlschrank stehen gelassen. Am nächsten Tag wurde wieder dekantiert und abgesaugt. Man nimmt das Sephadex dreimal in Startpuffer auf, dazwischen wird jedesmal dekantiert und vorsichtig, nicht ganz bis zur Trockene, abgesaugt.

Benzoylierte DEAE- Zellulose wurde in 2 M NaCl mit 10% Äthanol aufgenommen. Sie muß dann 5 h stehen. Dabei soll

gelegentlich umgerührt werden. Der größte Teil der Zellulose setzt sich am Boden ab. Die oben schwimmende Schicht wurde verworfen. Danach wurde abgesaugt und die Zellulose wurde mehrmals in Startpuffer aufgenommen und wieder abgesaugt.

DEAE- Zellulose suspendierte man in 0,5 n NaOH und ließ sie 30 min stehen. Darauf wurde sie mit Wasser bis zum Verschwinden der alkalischen Reaktion gewaschen. Danach suspendierte man 30 min in 0,5 n HCl und wusch solange, bis das Eluat wieder neutral reagierte. Anschließend nahm man die Zellulose noch mehrfach in Startpuffer auf und saugte sie jedesmal wieder ab.

RPC 5- Säulenmaterial wurde nur mehrfach in Startpuffer aufgenommen bevor es verwendet wurde.

Anwendung der Ionenaustauscher

Zur Isolierung von tRNA₃^{Lys} aus Kaninchenleber-tRNA wurden nacheinander eine Chromatographie an DEAE- Sephadex A-50 (28), an BD- Zellulose und eine RPC 5- Säule verwendet. Alle drei Säulenchromatographien erfordern einen geringen Aufwand an Material und trennen nach verschiedenen Prinzipien. Die erste Säule sollte eine große Kapazität für tRNA haben. DEAE- Sephadex A-50 erfüllt diese Bedingung. Die Trennung verschiedener tRNA- Spezies beruht sowohl auf ionischen Wechselwirkungen zwischen den quartären Diäthylaminoäthylgruppen des DEAE- Sephadex und den Phosphatgruppen der Nukleinsäuren, als auch auf einem

Molekularsiebeffekt der Sephadex- Matrix.

Bei der BD- Zellulose (30) sind Hydroxylgruppen der DEAE- Zellulose mit Benzoessäure verestert. Dadurch werden, zusätzlich zu den ionischen, nicht-ionische Wechselwirkungen mit den Basen der Nukleinsäurekette ermöglicht.

RPC 5- Säulen (31,32) wurden mit Erfolg bei der Fraktionierung von tRNAs angewendet. Vorteilhaft ist die schnelle Durchführung der Chromatographie in wenigen Stunden.

(RPC 5= "reversed phase chromatography" No 5.)

Die Chromatographie geschieht zwischen zwei flüssigen Phasen. Das weitgehend inerte Trägermaterial ist pulverisiertes Polytrifluorchloräthylen, beschichtet mit Adogen 464, einem Tricetylmethylammoniumchlorid, das die stationäre Phase bildet.

Tener- Säule (33): Bei Verwendung von DEAE- Zellulose in 7 M Harnstoff erfolgt die Auftrennung vornehmlich nach Ladung (Kettenlänge) der Oligonukleotide, d.h. Fragmente mit gleicher Anzahl von Nukleotiden werden im allgemeinen auch gemeinsam eluiert. Harnstoff verhindert die Aggregation von guanosinreichen Oligonukleotiden (89).

Zur Trennung von RNA- Fragmenten nach Basenzusammensetzung eignet sich DEAE- Zellulose in 7 M Harnstoff bei pH 3,0 . Bei diesem pH-Wert sind die Basen teilweise oder ganz protoniert(90).

4.2.3. Aminoacyl- tRNA- Synthetase aus Kaninchenleber und Prüfung auf Aminoacylierbarkeit von tRNA- Fraktionen.

Die Enzympräparation wurde bei 0°C durchgeführt. Eine frische, eisgekühlte Kaninchenleber wurde mit 80 ml Puffer A (0,01 M Tris·HCl pH 7,5, 0,01 M MgCl₂, 0,01 M Mercapto-äthanol, 10% Glycerin) zwei Minuten lang im Haushaltsmischer (Braun) homogenisiert. Danach wurde die Lösung 1 h lang bei 27500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und über Gaze filtriert. Das Filtrat wurde wieder zentrifugiert, diesmal 2 h bei 136000 g. Nach dem erneuten Abgießen und Filtrieren über Gaze wurde der Lösung festes NaCl bis zur Gesamtkonzentration von 0,3 M zugegeben. Die Lösung wurde dann auf eine mit 0,3 M NaCl und Puffer A äquilibrierte DEAE- Säule aufgetragen. Die endogene tRNA wird hierbei an die DEAE- Zellulose gebunden und auf der Säule zurückgehalten, während die Synthetasen von der DEAE- Zellulose eluiert werden. Das Eluat der Säule wird noch über Nacht gegen Glycerin- H₂O (1 : 1) dialysiert und bei -20°C aufbewahrt.

Diese Synthetasenfraktion wurde für Tests auf Aminoacylierbarkeit von tRNA- Fraktionen verwendet. Aliquote der Fraktionen aus den Säulenchromatographien wurden mit Synthetase, [³H-]-Lysin, ATP, CTP und Tris·HCl- Puffer pH 8,0 inkubiert (29) und ein Aliquot auf Filterscheibchen (2,4 cm S+S Nr 2316) aufgetragen (91). Die Filterscheib-

chen ließ man kurz antrocknen und warf sie dann in 5%ige Trichloroessigsäurelösung. Dabei fällt die aminoacylierte tRNA auf dem Filterscheibchen aus. Die nicht an tRNA gebundene Radioaktivität wurde in zwei weiteren Trichloroessigsäure-Bädern vom Filter gewaschen. Dann wurde in Äthanol/Äther 1 : 1 und danach in Äther gewaschen. Die Filterscheibchen wurden getrocknet, in kleine Plastikfläschchen gesteckt, dann wurde mit 100 µl 0,1 M NaOH das [^3H] - lysin von der tRNA abgespalten. Mit 50 µl HClO_4 (60%ig) wurde neutralisiert. Die radioaktive Aminosäure wurde dann in 10 ml PPO- Cellosolve- Toluol (15 g PPO, 1,25 l Cellosolve, 2,5 l Toluol) gelöst und im Szintillationszähler gemessen.

4.2.4. Enzyme zum Spalten von tRNA in Mono- und Oligonukleotide.

Ribonuklease F₁, aus *Aspergillus oryzae* (E.C. 3.1.4.8) (Ribonucleate- guanine- nucleotide- 2'- transferase, cyclizing)

RNase F₁ ist eine Endonuklease und spaltet RNA nach 3'-Guanosinphosphat. Zwischenprodukte sind zyklische 2',3'- Guanosinphosphate.

Inkubationsansatz: 1 A₂₆₀- Einheit tRNA wird in 100 µl 0,02 M TEAB- Puffer pH 8,0 mit 2 Einheiten Enzym 5 h lang bei 37°C inkubiert.

Ribonuklease T₂ aus *Aspergillus oryzae* (E.C. 3.1.4.23)

(Ribonuclease- 3'- oligonucleotido- hydrolase)

Das Enzym ist eine Endonuklease. Über zyklische 2',3'-Phosphate werden Mononukleotide mit einem 3'- Phosphat gebildet.

Inkubationsansatz: In 100 µl 0,001 M Kaliumacetat pH 4,7 werden 0,4 A₂₆₀- Einheiten Oligonukleotid mit 1 Einheit Enzym 5 h lang bei 37°C inkubiert.

Ribonuklease A (pankreatische Ribonuklease, E.C. 3.1.4.22)

aus Rinderpankreas.

(Ribonuclease- pyrimidine- nucleotido- 2'- transferase, cyclizing)

Pankreatische RNase ist eine Endonuklease. Sie spaltet RNA nach dem 3'- Phosphat von Pyrimidinen. Über zyklische 2',3'- Phosphate entstehen Spaltstücke mit einem 3'- Pyrimidinphosphat.

Inkubationsansatz: 0,5 A₂₆₀- Einheiten Oligonukleotid werden in 100 µl 0,02 M TEAB- Puffer pH 8,0 gelöst. Es wird mit 20 µg pankreatischer RNase 5 h lang bei 37°C inkubiert.

Schlangengiftphosphodiesterase (E.C. 3.1.4.1)

(Orthophosphoric- diester- phospho- hydrolase)

Schlangengiftphosphodiesterase ist eine Exonuklease, beginnt am 3'- Ende und ergibt Mononukleotide mit einem 5'- Phosphat. Nur wenn vor der Reaktion das 3'- Phosphat am Oligonukleotid entfernt wird, verläuft die Reaktion mit

mit ausreichender Geschwindigkeit.

Inkubationsansatz: 2 bis 5 A_{260} - Einheiten Oligonukleotid werden in 0,02 M TEAB- Puffer pH 8,5 mit 25 μ g Schlangengiftphosphodiesterase 5 h lang bei 37°C inkubiert.

Alkalische Phosphatase aus E.coli (E.C. 3.1.3.1)

(Orthophosphoric- monoesterphospho- hydrolase, alkaline optimum)

Das Enzym ist eine Phosphomonoesterase und spaltet endständiges Phosphat von Nukleotiden und Oligonukleotiden ab.

Inkubationsansatz: 2 bis 5 A_{260} - Einheiten Oligonukleotid werden in 500 μ l H_2O in 0,02 M TEAB- Puffer mit 2,5 bis 5 μ g Enzym versetzt und 5 h lang bei 37°C inkubiert.

Polynukleotidphosphorylase aus *Mikrococcus lysodeicticus*

(E.C. 2.7.7.8)

(Polynucleotide- orthophosphate- nucleotidyl- transferase)

Das Enzym katalysiert die Polymerisation von Nukleosid-5'- diphosphaten unter Abspaltung von Orthophosphat zu Polynukleotiden. In Umkehrung dieser Reaktion kann das Enzym in Gegenwart von Phosphat als 3'- Exonuklease wirken. Die Produkte der Exonukleasewirkung sind 5'- Trinukleotiddiphosphat und 5'- Dinukleotidmonophosphat vom 5'- Ende der abgebauten RNA und 5'- Nukleotiddiphosphate.

Inkubationsansatz: In einem Reaktionsvolumen von 500 μ l (mit 0,01 M Tris·HCl pH 8,0, 0,002 M $MgCl_2$, 0,01 M Kaliumphosphat pH 7,5) werden 2 bis 6 A_{260} - Einheiten Oligonukleotid mit 80 μ g Enzym 6 h lang bei 37°C inkubiert.

4.2.5. Entsalzen von tRNA- Fragmenten.

Die von der Tener-Säule (Abb.5) erhaltenen Fraktionsbereiche enthielten in der Pufferlösung 7 M Harnstoff. Die Fraktionsbereiche wurden auf das fünffache Volumen (bei Mono-, Di- und Trinukleotiden auf das zehnfache Volumen) mit Wasser verdünnt. Die Lösung wurde auf eine kleine (0,8 cm x 10 cm große) DE 23- Zellulose- Säule aufgetragen und mit 0,01 M TEAB- Puffer pH 8,5 nachgewaschen. Die von der Zellulose adsorbierten Fragmente wurden mit 2 M TEAB- Puffer pH 8,5 wieder eluiert. Der Puffer wurde dann im Vakuum rückstandsfrei abgezogen.

4.2.6. Dünnschichtchromatographie auf Zelluloseplatten.

Vor Verwendung der DSC- Platten wurden diese in $H_2O/\text{Äthanol}$ (80 : 20) entwickelt. Die Platten wurden dann bei $40^{\circ}C$ wieder getrocknet.

Wir verwendeten die folgenden Laufmittel:

- A Isobuttersäure/ NH_3/H_2O 577 : 38 : 385, pH 4,3
- B tButanol/ HCl/H_2O 7 : 1,5 : 1,5
- C Isobuttersäure/ NH_3/H_2O 66 : 1 : 33, pH 3,7
- D n- Propanol/ NH_3/H_2O 55: 10 : 35
- E Isopropanol/ NH_3/H_2O 7 : 1 : 2
- F t-Butanol/0,5 M $HCOOH$ 1 : 1 mit cNH_3 pH 3,8
- G 0,1 M Kaliumphosphat pH 6,8/Ammoniumsulfat/nPropanol
100 : 60 : 2 "Pabst III"
- H n-Butanol/Eisessig/ H_2O 90 : 10 : 25

Die nach Chromatographie im UV- Licht bei 254 nm sichtbaren Banden wurden angezeichnet und ausgekratzt. Die Isolierung des Mono-, bzw. Oligonukleotids erfolgte durch mehrmaliges AufschlÄmmen und jeweiliges Abzentrifugieren der Zellulose mit 0,01 M TEAB- Puffer pH 8,5, wobei das Oligonukleotid nach dem Eindampfen der vereinigten Überstände salzfrei zurückgewonnen wurde.

4.2.7. Vorversuche zur Sequenzierung der pankreatischen Fragmente.

Auftrennung der Oligonukleotide eines Fraktionsbereiches:

Von 0,4 A_{260} - Einheiten von jedem der Fraktionsbereiche 2 bis 11 der Tener- Säule (Abb.5) wurden die 3'- terminalen Phosphatgruppen abgespalten und zu gleichen Teilen auf zwei Dünnschichtplatten (Zellulose) aufgetragen. Eine Dünnschichtplatte wurde in Laufmittel C, die andere in Laufmittel D entwickelt. Durch das Abspalten des endständigen Phosphates werden die RF- Werte der Oligonukleotide erhöht. Der Versuch zeigte, welches der beiden Laufmittel für die präparative Auftrennung der in einer Fraktion enthaltenen Oligonukleotide am geeignetsten ist.

Nukleotidanalyse von Oligonukleotiden:

Dazu wurden auf eine 10 x 10 cm Dünnschichtplatte (Zellulose) links unten, vom Rand 0,5 cm entfernt, linsenförmig 0,2 A_{260} - Einheiten des mit Ribonuklease T_2 gespaltenen Oligonukleotids aufgetragen. Die Platte wurde dann in der ersten Dimension in Laufmittel A, nach dem Trocknen um

90° gedreht und im Laufmittel B entwickelt (46). Dadurch konnte schon vor der eigentlichen Sequenzierung eine Nukleotidanalyse erhalten werden.

4.2.8. Identifizierung von Mononukleosiden und Mononukleotiden.

Es wurden jeweils drei UV- Spektren bei pH 1, 7 und 13 angefertigt. Es wurde geprüft, ob Form und Lage der Spektren mit den Literaturangaben übereinstimmten. Außerdem mußte sich das erhaltene Nukleosid (Nukleotid) in mindestens zwei Laufmitteln der Dünnschichtchromatographie mit authentischem Material identisch verhalten.

Von zwei Nukleosiden der tRNA^{Lys}₃ wurden Massenspektren aufgenommen. 2'-O-Methylribothymidin (27) wurde mit Hilfe des Massenspektrums mit dem synthetisierten Produkt verglichen. Um von dem unbekannten Nukleosid X (Abb.23) ein Massenspektrum zu erhalten, mußte es silyliert werden.

Silylierung:

5 µl der wäßrigen Nukleosidlösung (mit 0,1 A₂₆₀- Einheiten, entspricht etwa 5 µg) wurden mit einer Kapillare aufgenommen und in ein einseitig abgeschmolzenes Röhrchen (Außendurchmesser 2 mm) geblasen. Das Lösungsmittel wurde im Vakuumexsikkator abgezogen. Eine Mischung von Bis-(trimethylsilyl-)acetamid (BSA) und Acetonitril im Verhältnis 1 : 3 wurde vorbereitet. 5 µl der Mischung wurden schnell in das Röhrchen mit dem trockenen Nukleosid geblasen. Das Röhrchen wurde sofort abgeschmolzen und blieb

In 15 min bei 140°C im Trockenschrank. Danach wurde es abgekühlt, an der Spitze aufgebrochen und im Exsikkator die überschüssige Reaktionsmischung abgezogen. Für das Massenspektrum wurde das Röhrchen etwa 3 mm über dem Boden abgebrochen und in den Feststoffeinlaß des Massenspektrometers eingeführt.

Massenspektrum:

Nach Erreichen des Vakuums im Massenspektrometer wurde zunächst bis 100°C aufgeheizt, wobei Acetamid (entsteht aus BSA nach Abspaltung der Silylgruppen) entweicht. Nach Wiedererreichen des Vakuums wurde innerhalb von 2 min von 100°C bis 300°C aufgeheizt, während vom Computer Spektren aufgenommen wurden.

Massenspektrum der Base aus dem Nukleosid X:

Abspalten der Ribose: $0,4 A_{260}$ -Einheiten X wurden 1 h lang im kochenden Wasserbad mit 0,5 ml 70%iger HClO_4 behandelt (92). Danach wurde mit KOH neutralisiert und der Niederschlag von KClO_4 abzentrifugiert.

Durch Dünnschichtchromatographie im Laufmittel

n-Butanol/Eisessig/ H_2O 4:1:1 wurde die Base X gereinigt.

4.2.9. Quantitative Analyse von Oligo- und Mononukleotiden

Die molaren Verhältnisse der Nukleoside (Nukleotide) aus einem Oligonukleotid wurden bestimmt, indem man die gemessenen A_{260} -Einheiten dividierte durch den jeweiligen

molaren Extinktionskoeffizienten ϵ_{260} .

4.2.10. Mg^{++} - katalysierte alkalische Hydrolyse von
tRNA₃^{Lys} (41).

Spaltung im analytischen Maßstab:

In einem Volumen von 100 μ l wurde 1 A_{260} - Einheit tRNA₃^{Lys} mit 0,05 M Tris·HCl pH 9,5 und 0,01 M $MgCl_2$ auf 50°C erhitzt. Aus der Reaktionslösung wurden nach 2, 2,5 und 3 h je 33 μ l entnommen, jeweils mit 0,5 μ l Eisessig versetzt, um die Reaktion zu beenden und auf ein 12% iges Polyacrylamidgel mit Tris·HCl- Borsäure- Puffer in 7 M Harnstoff aufgetragen. Zum Vergleich wurden daneben 0,15 A_{260} - Einheiten tRNA₃^{Lys} auf das Gel pipettiert. Nach der Elektrophorese und nach Anfärben mit Methylenblau zeigten sich außer dem Ausgangsmaterial bei der Reaktionszeit 2,5 h 4 definierte Banden. Nach 3 h Reaktionszeit waren nur noch schwache definierte Banden zu sehen.

Spaltung von tRNA₃^{Lys} im präparativen Maßstab:

50 A_{260} - Einheiten tRNA₃^{Lys} wurden in 5 ml Pufferlösung mit 0,05 M Tris·HCl pH 9,5 und 0,01 M $MgCl_2$ aufgenommen und 2,5 h bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μ l Eisessig beendet. Die Lösung wurde im Rotationsverdampfer eingeengt, in 3 ml 7 M Harnstoff aufgenommen und 1 min auf 100°C erhitzt, um eventuelle Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen. Zur Auftrennung der Fragmente wurde eine Säulenchromatographie mit DEAE-(DE23)

Zellulose in 7 M Harnstoff bei pH 3,0 durchgeführt. Die Elution erfolgt dabei nicht nach Kettenlänge, sondern nach Basenzusammensetzung. Die gesammelten Fraktionen wurden gleich mit Tris·HCl- Puffer auf neutralen pH- Wert gebracht, um Basenabspaltungen zu vermeiden.

Die Rechromatographie der isolierten Fraktionsbereiche wurde auf einer Tener- Säule (DEAE-Zellulose, 7 M Harnstoff) bei pH 7,5 durchgeführt. Dabei werden die Fragmente nach Ladung (Kettenlänge) getrennt (Abb.11).

4.2.11. Sequenzierung mit radioaktiven Arbeitstechniken

4.2.11.1. Herstellung von γ - [^{32}P] - ATP (93)

Die Reaktion wird durch folgende Gleichungen beschrieben:



Das anorganische [^{32}P] - Phosphat wird zuerst in

1,3- Diphosphoglycerat eingebaut (2). In der Reaktion (1) liegt das Gleichgewicht weit auf der linken Seite, sodaß aus kaltem ADP markiertes γ - [^{32}P] - ATP wird. (1) benötigt das Enzym Phosphoglycerat- Kinase, (2) braucht Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase.

Darstellung: 10 mCi trägerfreie [^{32}P] - Phosphorsäure in 1 ml H_2O wurden im leichten Stickstoffstrom in 2 bis 3 h eingetrocknet. Danach wurden folgende frisch bereitete Lösungen zugegeben: 17 μl 1 M Tris·HCl pH 8,0, 21 μl 0,1 M MgCl_2 , 15 μl 0,01 M ATP, 17 μl 0,01 M reduziertes

Glutathion, 12 μ l 0,01 M 3- Phosphoglycerinsäure. Dazu kommen noch 200 μ l H_2O . Der pH- Wert wurde mit 1 M Tris·HCl pH 8,0 auf 7,5 eingestellt. Zum Schluß wurden 6 μ l des Enzymgemisches Kaninchenmuskel- 3-phospho-glyceratdehydrogenase und 3-Phospho-glyceratkinase (Boehringer) zur Reaktionslösung zugegeben. Es wurde 45 min bei 26°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion mit 3 ml eiskaltem 0,01 M TEAB pH 8,0 abgebrochen und die gesamte Lösung auf eine DEAE-(DE23) Zellulose- Säule (30x0,5cm), äquiliibriert mit 0,01 M TEAB pH 8,0, aufgetragen. Eluiert wurde mit einem Gradienten von 0,01 M TEAB pH 8,0 bis 1 M TEAB pH 8,0 (Gesamtvolumen 150 ml).

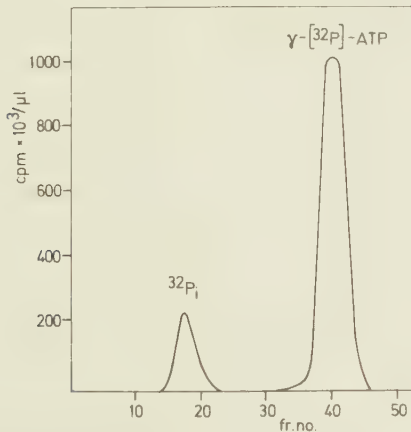


Abbildung 27: Synthese von γ -[^{32}P]-ATP: Trennung von [^{32}P]- H_3PO_4 und [^{32}P]-ATP durch Säulenchromatographie an DEAE-(DE23) Zellulose.

Von den Fraktionen (etwa 2,5 ml Fraktionsvolumen) wurde je 1 μ l auf Filterpapier aufgetragen und die Cerenkow-Strahlung im Tritium- Kanal des Szintillationszählers gemessen. Das zuerst eluierte Maximum enthält nicht umgesetztes [^{32}P] - Phosphat, das zweite Maximum γ - [^{32}P]-ATP. Dies konnte durch Mischen eines Aliquots mit kaltem ATP und Dünnschichtchromatographie auf Zelluloseplatten gezeigt werden.

Die Fraktionen 35 bis 39 wurden gesammelt, im Rotationsverdampfer zur Trockne einrotiert und in 450 μ l 0,01 M TEAB pH 8,0 aufgenommen. Die spezifische Aktivität wurde bestimmt, indem 1 μ l dieser Lösung in 1 ml H_2O gelöst wurde, davon wurde wieder 1 μ l genommen und die Cerenkow-Strahlung gemessen. Es ergaben sich 6850 cpm (Cer). Die Lösung enthält 308 pMol ATP pro μ l. (Sie muß für die 5'- [^{32}P] - Markierung von Oligonukleotiden zwischen 300 und 350 pMol/ μ l liegen.) Daraus ließ sich die spezifische Aktivität zu 22000 cpm/pMol ATP (Cer) berechnen.

Da die Zählausbeute bei der Messung von ^{32}P im Tritium-Kanal 35% beträgt, und da $2,2 \times 10^6$ dpm einem μCi entsprechen, war die spezifische Aktivität 30,5 Ci/mMol ATP.

4.2.11.2. Spalten von tRNA $\overset{\text{Lys}}{3}$ mit Ribonuklease T_1 oder pankreatische Ribonuklease und anschließende enzymatische Abspaltung endständiger Phosphate(57).

0,5 A_{260} - Einheiten tRNA $\overset{\text{Lys}}{3}$ wurden in einem Reaktionsvolumen von 85 μ l gespalten. Die Lösung wurde gepuffert durch

5 μ l 1 M Tris·HCl pH 8,0. Unter Eiskühlung gab man 2,5 Einheiten RNase T₁ oder 1 μ g pankreatische Ribonuklease dazu. Es wurde 3 h bei 37°C inkubiert. Danach müssen die 3'-terminalen Phosphate abgespalten werden; es wurde 0,1 Einheit alkalische Phosphatase in 1 μ l dazugegeben. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei 37°C. Um die Phosphatase zu inaktivieren, wurde die Lösung dann mit 15 μ l einer 0,04 M NTA-Lösung (Nitrilotriacetat = Titriplex I) versetzt. Nach 20 min Stehenlassen bei RT wurde 2 min auf 100°C erhitzt und dann sofort in Eis gestellt.

4.2.11.3. 5'-[³²P] - Phosphorylierung der Oligonukleotide mit T₄- Phagen- induzierter Polynukleotidkinase.

Von den im vorigen Abschnitt erhaltenen 101 μ l Hydrolysat wurden 5 μ l für die [³²P] - Markierung verwendet. Es wurden dazugegeben: 1 μ l 0,2 M MgCl₂ und 1 μ l 0,3 M Mercaptoäthanol, 4 μ l T₄- Kinase mit einer Konzentration von 1 Einheit pro μ l. Nach Zufügen von 10 μ l γ -[³²P] - ATP (300-350 pMol/ μ l) wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Überschüssiges γ -[³²P] - ATP würde im zweidimensionalen "Fingerprint" stören. Durch Umsetzen mit Glukose in Gegenwart von Hexokinase wurde es daher in [³²P] - Glukose- 6-phosphat übergeführt. Dieses läuft in der zweiten Dimension weit vor den Fragmenten.

Zum Inkubationsansatz wurden 4 μ l einer 0,01 M Glukose-lösung und 1 μ l Hexokinase (mit 0,2 μ g/ μ l) gegeben. Es

wurde 5 min bei 37°C inkubiert. Noch in der Lösung vorhandene Reste von γ -[³²P] - ATP wurden anschließend mit ATP-Lösung verdünnt, und zwar zweimal je 1 µl einer 5 mM ATP-Lösung wurden zugefügt. Die Inkubationszeit war jedesmal 10 min bei 37°C.

Die Inkubationsgläschen wurden im Wasserbad 2 min auf 100°C erhitzt, dann in Eis gestellt und bei -20°C eingefroren. Für einen "Fingerprint" durch Hochspannungselektrophorese wurden etwa 2 µl dieser Lösung benötigt.

4.2.11.4. Zweidimensionale Hochspannungselektrophorese "Fingerprint"

Ein Zelluloseacetatstreifen (3 x 55 cm) wurde mit dem Puffer Pyridin/Essigsäure pH 3,5 (5% Essigsäure, etwa 0,5% Pyridin bis zum pH 3,5) in 7 M Harnstoff befeuchtet. 2 µl der [³²P] - phosphorylierten Fragmente wurden aufgetragen und in Pyridin/Essigsäure pH 3,5 (ohne Harnstoff) bei 5000 V aufgetrennt. Die Elektrophoresedauer war etwa 1 h 15 min. Die Fragmente wurden danach vom Zelluloseacetatstreifen auf DEAE- Papier übertragen. Die Auftrennung in der zweiten Dimension erfolgt in 7% Ameisensäure etwa 16 h lang bei 500 V.

Das getrocknete DEAE- Papier wurde mit einem Röntgenfilm bedeckt. Exponiert wurde 1 bis 24 h je nach spezifischer Aktivität des zur Phosphorylierung verwendeten γ -[³²P] - ATP. Mittels der Schwärzung auf dem Röntgenfilm wurden die [³²P] - Oligonukleotide des "Fingerprints" lokalisiert.

Die Fragmente wurden vom DEAE- Papier mit 2 M TEAB pH 10,0 eluiert.

4.2.11.5. Endgruppenbestimmung

5000 bis 8000 cpm (Cer) 5'- [^{32}P] - markiertes Oligonukleotid wurde in 15 μl 0,05 M Tris·HCl pH 8,0 mit 1 μg Schlangengiftphosphodiesterase 2 h lang bei 37°C inkubiert. Die Inkubationslösung wurde im Exsikkator eingetrocknet und in 3 μl einer Lösung, die pA,pC,pU und pG enthielt, aufgenommen. Die 3 μl wurden zu gleichen Teilen auf zwei Dünnschichtplatten aufgetragen. Eine Platte wurde in Laufmittel A, die andere in Laufmittel B entwickelt. Nach Beendigung der Chromatographie wurden die Platten sorgfältig getrocknet und die 5'- [^{32}P] - Nukleotide durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die nicht radioaktiven 5'- Nukleotide wurden unter UV- Licht angezeichnet.

4.2.11.6. Partieller Abbau von 5'- [^{32}P] - markierten Oligonukleotiden mit Schlangengiftphosphodiesterase.

Inkubationsansatz: Ca.50000 cpm eines Oligonukleotids wurden in 30 μl wäßriger Lösung mit 30 mM Tris·HCl pH 8,5 und 6 mM Kaliumphosphat aufgenommen. Davon wurden 5 μl entnommen und auf die Startlinie auf einem DEAE- Papier aufgetragen. Dann wurden 0,6 μg Schlangengiftphosphodiesterase in 1 μl Lösung einpipettiert und vermischt. Nach 2 min, 10 min, 30 min und 60 min wurden je 5 μl der Lösung ent-

nommen und neben dem Nullwert auf die Startlinie aufgetragen (vgl. Abb. 8). Der Rest der Inkubationslösung wurde 5 min auf 37°C erwärmt und dann auf das DEAE- Papier aufgetragen. Zur Identifizierung der Endgruppen wurden pA, pG, pU und pC aufgetragen.

Die Hochspannungselektrophorese läuft über Nacht in 7% Ameisensäure oder Pyridin/Essigsäure pH 3,5.

Durch die sequentielle Abspaltung von Mononukleotiden vom 3'- Ende des Fragments entstehen Abbauprodukte, die sich jeweils durch den Verlust eines Mononukleotids vom 3'-Ende unterscheiden.

Das 3'- terminale Nukleotid eines jeden Spaltproduktes ergibt sich aus dem "M"- Wert ("migration value"), der für das betreffende 3'- terminale Nukleotid charakteristisch ist. M ist definiert als $\frac{x}{y}$, wobei y die Distanz irgendeines Oligonukleotids von der Startlinie, und x der Abstand zwischen diesem Oligonukleotid und seinem ersten Abbauprodukt ist (38).

Für die Spaltung von Oligonukleotiden mit Schlangengiftphosphodiesterase gelten bei Hochspannungselektrophorese auf DEAE- Papier bei pH 3,5, bzw. bei pH 1,9 folgende "M"- Werte (94):

Nukleotid	M(pH 3,5)	M (pH 1,9)
C	0,6-1,2	0,05-0,3
A	2,1-2,9	0,4-1,1
U	1,7-1,9	1,5-2,5
G	2,6-4,4	1,2-3,1

5. Zusammenfassung

- 1) Transfer-RNA aus Kaninchenleber wurde isoliert. Durch drei säulenchromatographische Reinigungsschritte wurde daraus tRNA₃^{Lys} rein erhalten.
- 2) tRNA₃^{Lys} wurde mit pankreatischer Ribonuklease und mit Ribonuklease T₁ (27) gespalten. Die Fragmente wurden sequenziert
 - (a) mit "klassischen" Methoden
 - (b) durch 5'- [³²P] - Markierung und Sequenzanalyse mit radioaktiven Arbeitstechniken.
- 3) Partialspaltungen von tRNA₃^{Lys}
 - (a) Durch partielle alkalische Hydrolyse in Gegenwart von Mg⁺⁺ wurden nach entsprechender säulenchromatographischer Reinigung 5 reine Fragmente von tRNA₃^{Lys} isoliert.
 - (b) Eines dieser Bruchstücke, ein 3'- Halbfragment von tRNA₃^{Lys} wurde mit Schlangengiftphosphodiesterase zu einem definierten kleineren Fragment abgebaut.
 - (c) Nach "Anilinspaltung" am m⁷G wurde das kürzere 3'- Fragment isoliert.
- 4) Diese Fragmente wurden ebenfalls sequenziert, aus den so erhaltenen Informationen wurde die Sequenz der tRNA₃^{Lys} abgeleitet. Sie enthält 76 Nukleotide, die

sich in der Form eines Kleeblatts anordnen lassen. Das Anticodon wird durch die Sequenz S-U-U gebildet, wobei S für 2-Thio-5-carboxymethyluridinmethylester ($\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$) steht. $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ ist voll aktiv in der Proteinbiosynthese und hat gegenüber dem Codon A-A-G eine Präferenz für das Codon A-A-A.

- 5) Von den 76 Nukleotiden der $\text{tRNA}_3^{\text{Lys}}$ sind 14 modifiziert. Durch Dünnschichtchromatographie und UV-Spektren bei pH 1, 7 und 13 wurden die Nukleoside m^7G , m^2G , D, Ψ , m^5C , m^1A , $\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$, Tm und X charakterisiert.
- 6) Das $\text{mcm}^5\text{s}^2\text{U}$ wurde in der ersten Position des Anticodons lokalisiert. In der entsprechenden Lysin-tRNA aus Rattenleber wurde ebenfalls eindeutig das gleiche Nukleosid gefunden. Diese Beobachtungen stehen im Widerspruch zu einer nicht reproduzierbaren Veröffentlichung aus dem Arbeitskreis von S. Nishimura.
- 7) 2'-O-Methylribothymidin (Tm) wurde in der Ribosomenbindungsschleife anstelle von Ribothymidin gefunden. Die Identifizierung erfolgte durch Dünnschichtchromatographie, UV-Spektren und Massenspektren. Authentisches Material wurde synthetisiert (27).
- 8) Neben dem 3'-Ende des Anticodons befindet sich ein hypermodifiziertes Nukleosid X. Durch UV-Spektren und Dünnschichtchromatographien wurde dieses noch nicht

beschriebene Nukleosid charakterisiert. Die Massenspektren des silylierten Nukleosids und der Base nach Abspalten der Ribose ergaben eine Masse $M = 181$ für die Base. Hochauflösende Massenspektren deuteten jedoch darauf hin, daß die Struktur der Base X wesentlich komplizierter ist, als man bei einem Molekulargewicht von 181 erwarten würde.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Crick, F. (1970)
Nature 227, 561-563
- 2 Brenner, S., Jacob, F. und Meselson, M. (1961)
Nature 190, 576-581
- 3 Wittmann, H.G. (1976)
Eur. J. Biochem. 61, 1-13
- 4 Hoagland, M.B. (1960)
in "The Nucleic Acids" (Herausgeber Chargaff, E. und Davids, J.N.), Acad. Press, New York, Vol. III, S. 349-408
- 5 Crick, F. (1966)
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 31, 3-9
- 6 Hoagland, M.B., Zamecnik, P.C. und Stephenson, M.L. (1957)
Biochim. Biophys. Acta 24, 215-216
- 7 Ogata, K. und Nohara, H. (1957)
Biochim. Biophys. Acta 25, 659-660
- 8 Staehelin, M., Rogg, H., Baguley, B.C., Ginsberg, T. und Wehrli, W. (1968)
Nature 219, 1363-1365
- 9 Keith, G., Picaud, F., Weissenbach, J., Ebel, J.B. Petrissant, G. und Dirheimer, G. (1973)
FEBS Letters 17, 306-308
- 10 Harada, F., Sawyer, R.C. und Dahlberg, J.E. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 3487-3497
- 11 Piper, P.W. und Clark, B.F.C. (1974)
Eur. J. Biochem. 45, 589-600
- 12 Holley, R.W., Apgar, J., Everett, G.A., Madison, J.T., Marquisee, M., Merrill, S.H., Penswick, J.R. und Zamir, A. (1965) Science 147, 1462-1464

- 13 Penswick, J.R., Martin, R. und Dirheimer, G. (1975)
FEBS Letters 50, 28-31
- 14 Söll, D. (1971)
Science 173, 293-299
- 15 Loftfield, R.B., Hecht, L.I. und Eigner, E.A. (1963)
Biochim. Biophys. Acta 72, 383-390
- 16 Crick, F. (1966)
J. Mol. Biol. 19, 548-555
- 17 Juarez, H., Juarez, D. und Hedgcoth, Ch. (1974)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 110-116
- 18 Gross, H.J. und Czerny, E., unveröffentlicht
- 19 Ofengand, J. und Henes, C. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 6241-6253
- 20 Shimizu, N., Hayashi, H. und Miura, K. (1970)
J. Biochem. 67, 373-387
- 21 Richter, D., Erdmann, V.A. und Sprinzl, M. (1973)
Nature New Biology 246, 132-135
- 22 Ortwerth, B.J. und Liu, L.P. (1973)
Biochemistry 12, 3978-3984
- 23 Ortwerth, B.J., Yonuschot, G.R. und Carlson, J.Y. (1973)
Biochemistry 12, 3985-3991
- 24 Waters, L.C., Mullin, B.C., Ho, T. und Wen-Kuang Yang
(1975)
Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 2155-2159
- 25 Holley, R.W. (1968)
in "Progress in Nucleic Acid Research and Molekular
Biology" (Herausgeber Davidson, J.N. und Cohn, W.E.),
Acad. Press, New York, Vol. 8, S. 37-49
- 26 Szekely, M. und Sanger, F. (1969)
J. Mol. Biol. 43, 607-617

- 27 Raba, M. (1976)
Dissertation, Universität München
- 28 Nishimura, S., Harada, F., Narushima, U. und Seno, T.
(1967)
Biochim. Biophys. Acta 142, 133-148
- 29 Hoskinson, R.M. und Khorana, H.G. (1965)
J. Biol. Chem. 240, 2129-2134
- 30 Gillam, J., Millward, S., Blew, D., von Tigerstrom, M.,
Wimmer, E. und Tener, G.M. (1967)
Biochemistry 6, 3043-3056
- 31 Roe, B., Marcu, K. und Dudock, B. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 319, 25-36
- 32 Pearson, R.L., Weiss, J.F. und Kelmers, A.D. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 228, 770-774
- 33 Tener, G.M. (1967)
in "Methods in Enzymology" (Herausgeber Grossmann, L.
und Moldgrave, K.), Acad. Press, New York, Vol. XII A,
398-404
- 34 Fink, R.M., Cline, R.E., McGaughey, C. und Fink, K.
(1956)
Anal. Chem. 28, 4-6
- 35 Madison, J.T. (1967)
in "Methods in Enzymology" (Herausgeber Grossmann, L.
und Moldgrave, K.), Acad. Press, New York, Vol. XII A,
137-139
- 36 Richardson, C.C. (1972)
Proc. Nucl. Acid Res. 2, 815-828
- 37 Panet, A., van de Sande, J.H., Loewen, P.C., Khorana,
H.G., Raae, A.J., Lillehaug, J.R. und Kleppe, K. (1973)
Biochemistry 12, 5045-5050

- 38 Sanger, F., Brownlee, G.G. und Barrell, B.G. (1965)
J. Mol. Biol. 13, 373-398
- 39 Sanger, F. und Tuppy, H. (1951)
Biochem. J. 49, 463-481
- 40 Labrie, F. und Sanger, F. (1969)
Biochem. J. 114, 29 P
- 41 Wintermeyer, W. und Zachau, H.G. (1973)
Biochim. Biophys. Acta 299, 82-90
- 42 Gross, H.J., unveröffentlicht
- 43 Wintermeyer, W. und Zachau, H.G. (1970)
FEBS Letters 11, 160-164
- 44 Simsek, M. Petrissant, G. und RajBhandary, U.L. (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 2600-2604
- 45 RajBhandary, U.L., Simsek, M., Raba, M., Limburg, K.,
Heckman, J. und Gross, H.J. (1974)
Fed. Proc. Abstracts 33, 1279
- 46 Saneyoshi, M. , unveröffentlicht
- 47 Brunngraber, E.F. und Chargaff, E. (1967)
J. Biol. Chem. 242, 4834-4840
- 48 McCloskey, J.A. (1974)
in "Basic Principles in Nucleic Acid Chemistry"
(Herausgeber Ts'o, P.O.P.) Acad. Press, New York,
Vol. I, 209-311
- 49 Dirheimer, G., Ebel, J.P., Bonnet, J., Gangloff, J.,
Keith, G., Krebs, B., Kuntzel, B., Roy, A., Weissenbach,
J. und Werner, C. (1972)
Biochimie 54, 127-144
- 50 Johnson, L., Hayashi, H. und Söll, D. (1970)
Biochemistry 9, 2823-2831
- 51 Roberts, R.J. (1972)
Nature New Biology 237, 44-45

- 52 Roe, B., Mignery, R., Marcu, K., Sirover, M. und
Dudock, B. (1973)
Fed. Proc. Abstracts 32, 585
- 53 Björk, G.R. und Isaksson, L.A. (1970)
J. Mol. Biol. 51, 83-100
- 54 Yang, S., Reinitz, E.R. und Gefter, M.L. (1973)
Arch. Biochem. Biophys. 157, 55-62
- 55 Piper, P.W. (1975)
Eur. J. Biochem. 51, 283-293
- 56 Simsek, M. und RajBhandary, U.L. (1972)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 49, 508-515
- 57 Simsek, M., Ziegenmeyer, J., Heckman, J. und
RajBhandary, U.L. (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 1041-1045
- 58 Piper, P.W. und Clark, B.F.C. (1973)
FEBS Letters 30, 625-627
- 59 Petrissant, G. (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 1046-1049
- 60 Watanabe, K., Oshima, T., Saneyoshi, M. und Nishimura,
S. (1974)
FEBS Letters 43, 59-63
- 61 Randerath, E., Chia, Li-Li S.Y., Morris, H.P. und
Randerath, K. (1974)
Biochim. Biophys. Acta 366, 159-167
- 62 Gray, M.W. und Lane, B.G. (1967)
Biochim. Biophys. Acta 134, 243-257
- 63 Hall, R.H. (1971)
in "The Modified Nucleosides in Nucleic Acids",
Columbia University Press, New York.
- 64 Rosenthal, L.J. und Zamecnik, P.C. (1973)
Proc. Natl. Acad. Sci. 70, 865-869

- 65 Wildenauer, D. und Gross, H.J. (1974)
Nucl. Acids Res. 1, 279-288
- 66 Gross, H.J., Simsek, M., Raba, M., Limburg, K.,
Heckman, J. und RajBhandary, U.L. (1974)
Nucl. Acids Res. 1, 35-43
- 67 Brownlee, G.G., Sanger, F. und Barrell, B.G. (1967)
Nature 215, 735-737
- 68 DuBuy, B. und Weissman, S.M. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 747-761
- 69 Marotta, C.A., Levy, C.C., Weissman, S.M. und
Varicchio, F. (1973)
Biochemistry 12, 2901-2904
- 70 Forget, B.G. und Weissman, S.M. (1967)
Science 158, 1695-1699
- 71 Williamson, R. und Brownlee, G.G. (1969)
FEBS Letters 3, 306-308
- 72 Hindley, J. und Page, S.M. (1972)
FEBS Letters 26, 157-160
- 73 Svensson, J., Isaksson, L. und Henningsson, A. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 238, 331-337
- 74 Heckman, J. (1975)
Dissertation, Massachusetts Institute of Technology,
Cambridge, USA
- 75 Squires, C. und Carbon, J. (1971)
Nature New Biology 233, 274-277
- 76 Sekiya, T., Takeishi, K. und Ukita, T. (1969)
Biochim. Biophys. Acta 182, 411-426
- 77 Yoshida, M., Takeishi, K. und Ukita, T. (1970)
Biochim. Biophys. Acta 228, 153-166
- 78 Ohashi, Z., Saneyoshi, M., Harada, F., Hara, H. und
Nishimura, S. (1970)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 40, 866-872

- 79 Kimura-Harada, F., Saneyoshi, M. und Nishimura, S.
(1971)
FEBS Letters 13, 335-338
- 80 Nishimura, S. und Weinstein, J.B. (1969)
Biochemistry 8, 832-842
- 81 Keith, G., Ebel, J.P. und Dirheimer, G. (1974)
FEBS Letters 48, 50-52
- 82 Simsek, M., RajBhandary, U.L., Boissard, M. und
Petrissant, G. (1974)
Nature 247, 518-520
- 83 Zachau, H.G. (1969)
Angewandte Chemie 81, 645-662
- 84 Fittler, F. und Hall, R.H. (1966)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 25, 441-446
- 85 Thiede, R. und Zachau, H.G. (1968)
Eur.J. Biochem. 5, 546-555
- 86 Powers, D.M. und Peterkowsky, A. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 6394-6401
- 87 Chheda, G.B. (1969)
Life Sci. 8, 979-987
- 88 Rogg, H., Wehrli, W., Staehelin, M. (1969)
Biochim. Biophys. Acta 195, 13-15
- 89 Lipsett, M.N. und Heppel, L.A. (1963)
J. Am. Chem. Soc. 85, 118
- 90 Rushinzky, G.W., Bartos, E.M. und Sober, H.A. (1964)
Biochemistry 3, 626-629
- 91 Mans, R.J. und Novelli, G.M. (1960)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 3, 540-543

- 92 Arnold, H. und Kersten, H. (1973)
FEBS Letters 36, 34-38
- 93 Glynn, I.M. und Chappell, J.B. (1964)
Biochem. J. 90, 147-149
- 94 Brownlee, G.G. (1972)
in "Determination of Sequences in RNA" (Herausgeber
Work, T.S. und Work, E.) North-Holland Publishing
Company, Amsterdam.

7. Lebenslauf

Am 19. November 1943 wurde ich als Sohn des heutigen Amtsinspektors Franz Limburg und seiner Ehefrau Johanna, geb. Albert, in Zwickau/Sa. geboren.

In Kaufbeuren/Allg. besuchte ich von 1949 bis 1954 die Volksschule, anschließend die Oberrealschule bis zur Reifeprüfung im Jahre 1964. Nach Ableisten des Wehrdienstes begann ich im Wintersemester 1966/67 mit dem Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München. Im Juli 1972 legte ich die mündliche Diplom-Chemiker-Hauptprüfung ab. Von November 1972 bis Dezember 1975 wurde die vorliegende Diplom- und Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München in der Abteilung " Organische Chemie und Spektroskopie " unter der Anleitung von Dr. H.J. Gross durchgeführt.

